



TESIS DOCTORAL

**EL RECEPTOR AHR EN PLURIPOTENCIA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS  
TEMPRANA, LA CARCINOGENÉISIS PULMONAR Y LA SENESCENCIA**

ANA NACARINO PALMA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR,  
BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

2020

La conformidad del director de tesis consta en el original en papel de esta  
tesis doctoral

Director de la Tesis: Pedro María Fernández Salguero.



# Índice

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>8</b>
1- El receptor de Aryl Hidrocarburos ( <i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i> , AhR).....	10
2- Estructura proteica de AhR.....	13
3- Mecanismos de activación y de localización celular de AhR .....	15
4- AhR en la fisiología celular .....	21
5- AhR en pluripotencia y diferenciación.....	25
6- Papel de AhR en cáncer .....	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
1. Modelos animales.....	38
2. Genotipado. ....	40
3. Obtención de embriones preimplantacionales .....	43
4. Cultivo primario de fibroblastos de la cola: Tail Tips Fibroblasts (TTFs) .....	44
5. Cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs).....	45
6. Activación de la expresión del oncogén K-RasG12D mediante administración de AdenoCre por infección intranasal.....	46
7. Cultivo y mantenimiento de la línea celular IMR-90 .....	46
8. Tratamientos.....	47
9. Irradiación de las células.....	47
10. Inmunocitoquímica .....	48
11. Análisis de niveles proteicos mediante inmunoblotting (Western-blotting) ...	49

12.	Análisis de la expresión génica mediante transcripción reversa (RT) y PCR cuantitativa (qPCR).....	52
13.	Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR. ....	53
14.	Análisis del ciclo celular.....	56
15.	Medida de la proliferación celular. ....	56
16.	Tinción con hematoxilina y eosina .....	57
17.	Inmunofluorescencia de tejidos.....	57
18.	Inmunofluorescencia por Whole Mount de embriones de ratón.....	58
19.	Separación magnética de blastómeros de trofotodermo y masa celular interna (Inner Cell Mass, ICM) .....	60
20.	Análisis del volumen mitocondrial mediante tinción con Mitotracker Green ..	61
21.	Medida la actividad mitocondrial mediante tetrametilrodamina (TMRM) .....	62
22.	Medida de la actividad mitocondrial mediante JC10.....	63
23.	Medida de la actividad Hexoquinasa .....	64
24.	Análisis de senescencia celular en hígado .....	65
25.	Cuantificación de células progenitoras hepáticas.....	66
26.	Cuantificación de células progenitoras en médula ósea .....	67
27.	Obtención de plasma sanguíneo.....	67
28.	Análisis de senescencia en cultivos celulares .....	68
29.	Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) .....	68
30.	Análisis de citoquinas mediante Bioplex.....	70
31.	Análisis estadístico .....	71
<b>CAPÍTULO I .....</b>		<b>72</b>
<b>INTRODUCCIÓN I.....</b>		<b>75</b>

1. Embriogénesis en el ratón .....	75
2. Diferenciación de las células madre embrionarias .....	77
3. Primera decisión de destino: Masa celular interna (ICM) y TE (Trophoblasto) ..	80
4. Segunda decisión de destino: Epiblasto (EPI) y endodermo primitivo (PE) .....	83
<b>OBJETIVOS I .....</b>	<b>85</b>
<b>RESULTADOS I .....</b>	<b>89</b>
1. La expresión y la localización de AhR se encuentra modulada a lo largo del desarrollo embrionario .....	89
2. Los embriones carentes de AhR presentan sobreexpresión de los genes de pluripotencia en los estadios iniciales del desarrollo .....	91
3. La localización de Nanog se ve modificada en función de la presencia de AhR durante el desarrollo embrionario preimplantacional .....	93
4. La depleción de AhR altera el patrón proteico de Oct4 durante el desarrollo embrionario .....	95
5. La ruta <i>Hippo</i> se encuentra sobreactivada en embriones <i>AhR</i> <sup>-/-</sup> .....	98
6. Los embriones carentes de AhR muestran una actividad metabólica preferentemente glucolítica, manteniendo una menor tasa de metabolismo oxidativo	102
7. Los blastocistos <i>AhR</i> <sup>-/-</sup> presentaron menor grado de diferenciación .....	107
<b>DISCUSIÓN I .....</b>	<b>111</b>
<b>CONCLUSIONES I .....</b>	<b>118</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>121</b>
<b>INTRODUCCIÓN II .....</b>	<b>124</b>
1. Ras GTPasas .....	124
2. K-Ras y la vía de señalización de las MAPK .....	125

3. Oncogén KRas .....	126
4. Adenocarcinoma pulmonar .....	128
<b>OBJETIVOS II .....</b>	<b>131</b>
<b>RESULTADOS II.....</b>	<b>134</b>
1. La depleción de AhR aceleró la aparición de patologías proliferativas ocasionadas por la mutación KRas G12D en pulmón .....	134
2. El proceso tumoral generado por la mutación KRasG12D en pulmón se desarrolló de forma más lesiva en ausencia de AhR.....	136
3. Los ratones <i>AhR</i> <sup>-/-</sup> / <i>KRas</i> <sup>LSL-G12D/+</sup> presentaron una proporción más elevada de células progenitoras/iniciadoras de tumor en estadios de inducción tempranos. ....	138
4. El marcador de pluripotencia Sox2 se encontró sobreexpresado en los tumores de pulmones <i>AhR</i> <sup>-/-</sup> / <i>KRas</i> <sup>LSL-G12D/+</sup> . ....	142
5. La expresión de marcadores de células madre cancerosas aumentó durante el desarrollo de adenocarcinomas pulmonares en ausencia de AhR. ....	144
6. La ausencia de AhR afectó a la progresión del ciclo celular de los fibroblastos embrionarios KRasG12D .....	150
<b>DISCUSIÓN II .....</b>	<b>153</b>
<b>CONCLUSIONES II .....</b>	<b>157</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>158</b>
<b>INTRODUCCIÓN III.....</b>	<b>161</b>
1. Envejecimiento .....	161
2. Senescencia.....	163
3. Senescencia y AhR .....	166
4. Senescencia y cáncer .....	168
<b>OBJETIVOS III .....</b>	<b>169</b>

<b>RESULTADOS III.....</b>	<b>172</b>
1. Los cultivos primarios de fibroblastos adultos procedentes de ratones <i>AhR</i> <sup>-/-</sup> mostraron un aumento en los niveles de senescencia .....	172
2. Los fibroblastos de la cola (TTFs) <i>AhR</i> <sup>-/-</sup> mantuvieron mayores tasas de quiescencia celular y de daño genómico .....	175
3. La ausencia de AhR generó disfunción mitocondrial en TTFs. ....	177
4. Los animales <i>AhR</i> <sup>-/-</sup> desarrollaron tumores hepáticos espontáneos durante el proceso de envejecimiento .....	178
5. La ausencia de AhR causó un aumento en el contenido de células senescentes en hígado.....	180
6. Los ratones carentes de AhR presentaron un mayor contenido en células progenitoras en hígado y médula ósea durante el envejecimiento. ....	181
7. La población de células indiferenciadas en hígado y médula ósea fue superior en ausencia de AhR, incluso durante el envejecimiento. La expresión de AhR disminuyó durante el proceso de envejecimiento .....	183
8. En ausencia de AhR se incrementaron los niveles hepáticos de marcadores de senescencia e inflamación .....	184
9. AhR se une a los promotores de genes de senescencia y de factores del SASP .	186
10. La ausencia de AhR provocó un aumento en los niveles de varios factores del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) .....	187
11. Los ratones <i>AhR</i> <sup>-/-</sup> presentaron un consumo de glucosa superior a nivel hepático.....	189
12. La eliminación de células senescentes redujo los niveles de AhR .....	190
13. La modulación farmacológica de AhR alteró la tasa de senescencia en fibroblastos humanos.....	191
<b>DISCUSIÓN III .....</b>	<b>196</b>
<b>CONCLUSIONES III .....</b>	<b>201</b>

<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>203</b>
---------------------------	------------



# INTRODUCCIÓN



### 1- El receptor de Aryl Hidrocarburos (*Aryl Hydrocarbon Receptor*, AhR)

El descubrimiento y caracterización bioquímica del receptor de aril hidrocarburos o también denominado receptor de dioxinas (**AhR**, *Aryl hydrocarbon Receptor*) se llevó a cabo a finales de los años '70 en el citosol de células de hígado de ratón, describiéndose en ese momento como una proteína implicada en la detoxificación de xenobióticos a través de la inducción de enzimas detoxificantes tales como el citocromo P450 CYP1A1 (Okey et al., 1979; Poland & Knutson, 1982). En estudios posteriores, con la llegada de técnicas de Biología Molecular, se describió la translocación de AhR al núcleo inducida por la unión de ligandos exógenos, generalmente hidrocarburos policíclicos aromáticos (Greenlee & Poland, 1979; Okey et al., 1979) y se definió su mecanismo básico de acción con el hallazgo de la proteína nuclear que se denominó *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (ARNT) (Reyes, Reisz-Porszasz, & Hankinson, 1992).

A mediados de los años '90, la producción de modelos animales generados por técnicas de *gene knock-out* permitió confirmar el papel toxicológico de AhR, al constatar la resistencia de los ratones carentes del receptor (*AhR*<sup>-/-</sup>) a los efectos tóxicos y carcinogénicos de xenobióticos agonistas de AhR como la dioxina (2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-*p*-dioxina, TCDD) y el benzo-*[a]*-pireno (BaP) (P. M. Fernandez-Salguero, Hilbert, Rudikoff, Ward, & Gonzalez, 1996; Mimura et al., 1997; Shimizu et al., 2000). Ensayos *in vitro* posteriores permitieron demostrar que AhR es un factor de transcripción cuya activación es necesaria para los efectos tóxicos y carcinogénicos de una amplia gama de compuestos xenobióticos incluyendo hidrocarburos aromáticos halogenados (HAHs), compuestos policíclicos aromáticos (PAHs) y bifenilos policlorinados (PCBs). Se demostró también que dicha función transcripcional tiene lugar mediante la inducción de citocromos P450 (CYP450) de la superfamilia 1 (CYP1A1, 1A2, 1B1 y 1S1) así como de

enzimas de la fase II hepática como la aldehído deshidrogenasa citosólica (ALDH3c) y la UDP glucuronosiltransferasa-1 (UGT1\*06) (Okey et al., 1979; Poland et al., 1976; Poland & Knutson, 1982).

Dada la importancia de estos xenobióticos desde el punto de vista toxicológico y carcinogénico, numerosas investigaciones se centraron en el mecanismo molecular de acción de AhR, tratando de definir su ruta de señalización y de comprender su función como regulador transcripcional. A su vez, los modelos *knock-out* murinos comenzaron a producir resultados que revelaban un inesperado papel fisiológico de AhR. Los ratones carentes de la expresión del receptor (*AhR*<sup>-/-</sup>) presentaban, *per se*, múltiples cambios fenotípicos que incluyeron alteraciones reproductoras, patologías hepáticas y cardíacas así como defectos en los sistemas vascular e inmune (Benedict, Lin, Loeffler, Peterson, & Flaws, 2000; P. M. Fernandez-Salguero, Ward, Sundberg, & Gonzalez, 1997; S. S. Lee et al., 1995; Mimura et al., 1997; J. M. Peters et al., 1999). Desde el punto de vista evolutivo, se comprobó que AhR posee una secuencia proteica altamente conservada entre diferentes especies (Hahn, 2002), un patrón de expresión constitutivo durante el desarrollo en tejidos adultos (B. D. Abbott, Birnbaum, & Perdew, 1995) y que está presente en el genoma en todo el rango de Metazoos, los cuales surgieron millones de años antes de la existencia de dioxinas en la Biosfera. Dadas las evidencias acumuladas, a mediados de los años 2000 se aceptó ampliamente que AhR cumple una función relevante en la biología, el desarrollo y la fisiología celular (Baba et al., 2005; Elizondo et al., 2000b; P. Fernandez-Salguero et al., 1995; Puga, Tomlinson, & Xia, 2005).

La nueva información disponible, llevó a la conclusión de que el papel toxicológico de AhR podría ser un mecanismo adaptativo a la aparición de xenobióticos en la Biosfera, siendo aquel una versión exacerbada de la función fisiológica del receptor (Fujii-Kuriyama & Kawajiri, 2010). Así, por ejemplo, mientras que la activación de AhR por ligandos exógenos tales como TCDD o BaP provoca el bloqueo de la replicación del DNA y la parada del ciclo celular en G0/G1 y G2/M (Puga et al., 2002), su actividad basal (i.e. en ausencia de xenobióticos) promueve la progresión del ciclo celular en fibroblastos embrionarios, de

manera que las células carentes de AhR presentan menor proliferación y mayor tasa apoptótica que las silvestres (Elizondo et al., 2000b; P. Fernandez-Salguero et al., 1995).

Teniendo en cuenta el papel de AhR como factor de transcripción en la respuesta a xenobióticos, una de las principales líneas de investigación en los últimos años ha sido la búsqueda de dianas transcripcionales desde el punto de vista fisiológico. A este respecto, se ha demostrado que AhR participa en la regulación transcripcional de genes que codifican para la DNA polimerasa kappa (Ogi et al., 2001), N-miristoiltransferasa 2 (Kolluri, Balduf, Hofmann, & Gottlicher, 2001), p27<sup>Kip1</sup> (Kolluri, Weiss, Koff, & Gottlicher, 1999), Bax (Matikainen et al., 2001), T-Cadherina (Niermann, Schmutz, Erne, & Resink, 2003), c-Myc (Yang et al., 2005), Slug/SNAI2 (Ikuta & Kawajiri, 2006), Vav3 (Carvajal-Gonzalez, Mulero-Navarro, et al., 2009), la proteína de unión a TGF $\beta$  latente LTBP-1 (Gomez-Duran et al., 2008) y la proteína de maduración de linfocitos B (Ikuta, Ohba, Zouboulis, Fujii-Kuriyama, & Kawajiri, 2010) entre otros. Adicionalmente, AhR regula la expresión de los genes de pluripotencia y diferenciación *OCT4* y *NANOG* en células de carcinoma embrioide humano NTERA-2 (González-Rico et al., 2020; Morales-Hernandez et al., 2016). Otros estudios sugieren que AhR también actúa como cofactor modulando la actividad de reguladores transcripcionales como NF- $\kappa$ B, que media reacciones inflamatorias y estrés oxidativo (Tian, Ke, Denison, Rabson, & Gallo, 1999), proteína del retinoblastoma (pRb) que regula la transición G1/S del ciclo celular (Huang & Elferink, 2005) y el receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) (Klinge, Bowers, Kulakosky, Kamboj, & Swanson, 1999; Wormke, Stoner, Saville, & Safe, 2000).

Por otro lado, AhR parece tener funciones no relacionadas con su actividad transcripcional. Se ha descrito su participación en rutas de señalización activadas por mitógenos (MAPK) (Tan, Chang, Puga, & Xia, 2002), por estrógenos (Ohtake et al., 2003; Wormke et al., 2003), por la proteína quinasa c-Src (A. Blankenship & Matsumura, 1997; Vogel et al., 2004) o como constituyente del complejo de señalización de membrana plasmática en el que se encuentran la integrina  $\beta$ 1, c-Src, CBP/CSK y Caveolina 1 (Javier

Rey-Barroso et al., 2014; J. Rey-Barroso et al., 2013) Por último, se ha descrito que AhR puede tener actividad E3 ubiquitina ligasa dependiente de ligando (Ohtake et al., 2007).

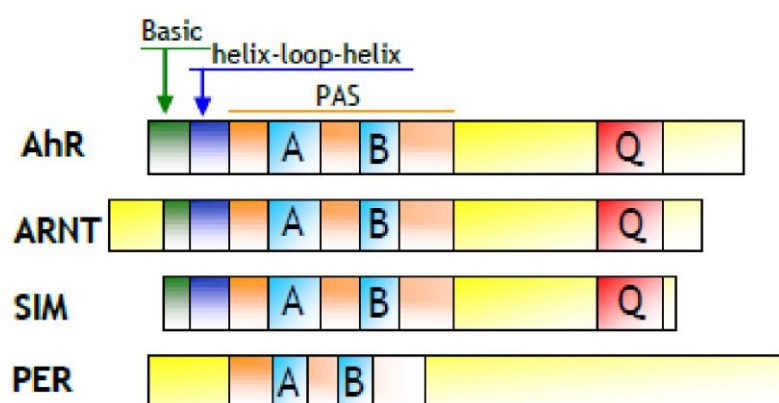
## 2- Estructura proteica de AhR

La clonación y secuenciación del gen que codifica para el AhR murino en 1992 (Burbach, Poland, & Bradfield, 1992; Ema et al., 1992), permitió su clasificación en la superfamilia de factores de transcripción con secuencias del tipo *basic-Helix-Loop-Helix* (bHLH). Dentro de esta superfamilia, posee características diferenciales como el disponer de sitios de unión para ligandos exógenos y dominios del tipo PAS [**P**er (*Period*, proteína que mantiene el ritmo circadiano en *Drosophila melanogaster*), **A**RNT y **S**im (*Single Minded*, proteína reguladora del desarrollo del sistema nervioso central de *Drosophila melanogaster*)]. Esta familia de factores de transcripción bHLH/PAS está implicada en el control de un amplio abanico de procesos fisiológicos tales como embriogénesis, desarrollo neuronal, ritmo circadiano, angiogénesis, metabolismo y respuesta a hipoxia (Alexander, Ganem, Fernandez-Salguero, Gonzalez, & Jefcoate, 1998; Chan, Yao, Gu, & Bradfield, 1999; P. Fernandez-Salguero et al., 1995; Fukunaga, Probst, Reisz-Porszasz, & Hankinson, 1995; Sonnenfeld et al., 1997; Whitlock, 1999).

Desde el punto de vista estructural (Figura I.1), en el extremo amino de la proteína se encuentra el dominio bHLH: la región básica media la unión al DNA mientras que la región HLH es necesaria para la heterodimerización con ARNT. Siguiendo hacia el extremo C-terminal se localiza el dominio PAS, que está formado por dos copias de una repetición degenerada de unos 50 aminoácidos denominados PAS-A y PAS-B, separadas entre sí por otros 110 aminoácidos. La región PAS-B contiene parte del dominio de unión al ligando y una secuencia necesaria para su interacción con el chaperón de respuesta a estrés térmico *Heat shock protein-90* (Hsp90) (Procopio, Lahm, Tramontano, Bonati, & Pitea, 2002). El extremo C-terminal de AhR está parcialmente conservado en ARNT y Sim, compartiendo

todos ellos una región rica en glutamina (Q) similar a los dominios de transactivación presentes en otros factores de transcripción, y cuya pérdida, aunque no afecta ni a la unión al DNA ni al ligando (Fukunaga et al., 1995), sí impide la interacción con coactivadores no caracterizados completamente, cuya unión determinaría la tasa final de transcripción.

Adicionalmente, se ha identificado una región NLS (*Nuclear Localization Signal*), situada en el extremo amino terminal de la proteína, que es reconocida por el complejo que forma el poro nuclear (Ikuta, Eguchi, Tachibana, Yoneda, & Kawajiri, 1998). Finalmente, AhR presenta dos regiones NES (*Nuclear Export Signal*), una en el dominio bHLH y otra en el dominio PAS-A, ambas ricas en leucina y reconocidas por la proteína CRM1 (*Chromosome Region Maintenance 1*) (Berg & Pongratz, 2001; Ikuta et al., 1998).

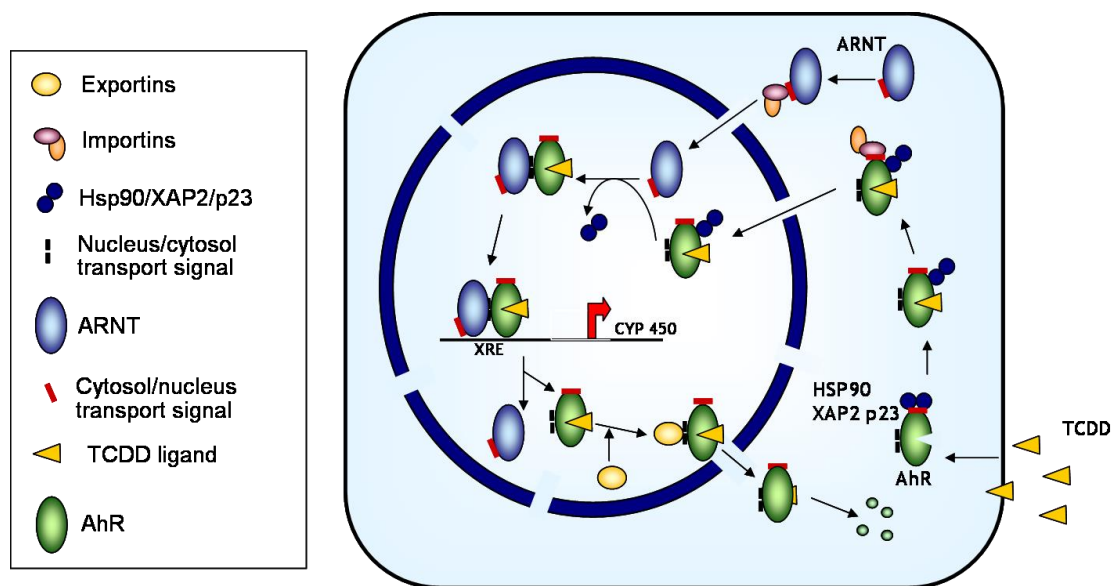


**Figura I.1.** Esquema de la estructura de varios miembros de la familia de reguladores transcripcionales bHLH/PAS: AhR y ARNT de ratón y SIM y PER de *Drosophila melanogaster*. Se indican las regiones de homología y los dominios funcionales de cada proteína.

### 3- Mecanismos de activación y de localización celular de AhR

La actividad transcripcional de AhR puede verse regulada por numerosos factores, tanto químicos como biológicos. Dado que la mayor parte de los estudios sobre este receptor se ha centrado en el mecanismo de regulación transcripcional de genes implicados en el metabolismo de xenobióticos, el modelo comúnmente aceptado es el que se muestra en la Figura 1.2. En ausencia de xenobióticos, la forma inactiva de AhR se encuentra predominantemente en el citosol asociada a un complejo de chaperones moleculares que al menos incluye: (i) dos moléculas de Hsp90 que mantienen al receptor en una conformación proclive a la unión de ligando e impiden su unión prematura a ARNT (Perdew, 1988; Wilhelmsson et al., 1990); (ii) una molécula de la proteína p23 que promueve la liberación de las Hsp90 tras la unión del ligando (Kazlauskas, Poellinger, & Pongratz, 1999); y una de la inmunofilina XAP2 (*Hepatitis B virus X-Associated Protein 2*) (Meyer, Pray-Grant, Vanden Heuvel, & Perdew, 1998), también conocida como ARA9 (*AHR-Associated Protein 9*) (Carver & Bradfield, 1997) o AIP (*AHR-Interacting Protein*) (Ma & Whitlock, 1997), la cual estabiliza la localización citoplásmática de AhR y evita su degradación temprana vía proteasoma (Davarinos & Pollenz, 1999) (Roberts & Whitelaw, 1999).





**Figura I.2.** Mecanismo de regulación transcripcional por AhR de genes implicados en el metabolismo de xenobióticos.

Cuando AhR se activa por la unión del ligando en el citosol, se liberan las Hsp90 y las demás proteínas chaperonas asociadas (Kazlauskas et al., 1999; Kazlauskas, Sundstrom, Poellinger, & Pongratz, 2001; Lees & Whitelaw, 1999). AhR se transloca entonces al núcleo, dónde se acumula y heterodimeriza con ARNT en una relación molecular 1:1. El complejo AhR/ARNT se une al DNA en secuencias consenso denominadas XREs o DREs (*Xenobiotic/Dioxin Response Elements*: 5'-GCGTG-3') situadas en regiones promotoras de genes diana, incrementando o reduciendo la tasa de transcripción de los mismos (Rowlands & Gustafsson, 1997).

A la actividad transcripcional de AhR contribuyen también cofactores transcripcionales ubicuos (Tabla I.1). Así, se ha descrito que el complejo p300/CBP (*cAMP response element binding protein (CREB)-Binding Protein*) facilita la interacción entre el heterodímero AhR/ARNT con los componentes de la maquinaria basal de transcripción asociados al promotor mínimo caja TATA. Esta interacción se realiza a través de ARNT (Kobayashi, Numayama-Tsuruta, Sogawa, & Fujii-Kuriyama, 1997). Miembros de la familia

SRC (**Steroid Receptor Coactivator**) se unen a AhR a través de la región rica en glutamina próxima a su extremo C-terminal, regulando su actividad (Kumar, Ramadoss, Reen, Vanden Heuvel, & Perdew, 2001). También se ha observado la interacción de AhR con SRC-1, NCoA-2 y p/CIP en el promotor del gen *Cyp1a1* murino cuando el receptor se encuentra unido a ligando (Beischlag et al., 2002). El coactivador RIP140 (**Receptor Interacting Protein 140**) también se une a AhR para aumentar su actividad transcripcional.

Una vez modulada la tasa de transcripción de los genes diana, AhR se disocia de ARNT, quedando accesible su región NES de exportación nuclear, la cual es reconocida por CRM1. La unión de CRM1 induce el transporte del receptor al citosol donde es ubiquitinado y degradado por el proteasoma (Ma & Baldwin, 2000; Roberts & Whitelaw, 1999; Santiago-Josefat, Pozo-Guisado, Mulero-Navarro, & Fernandez-Salguero, 2001).

Factor/proceso		Consecuencia funcional
<b>Componentes del complejo AhR citosólico o nuclear</b>		
	<i>Hsp90</i>	Mantiene AhR en conformación de unión a ligando e impide la dimerización con ARNT (Perdew, 1988; Wilhelmsson et al., 1990)
	<i>AIP/ARA9/XAP2</i>	Estabiliza AhR y favorece su localización citoplasmática (Meyer et al., 1998; Pollenz, Wilson, & Dougherty, 2006)
	<i>p23</i>	Media la liberación de Hsp90 de AhR (Kazlauskas et al., 1999)
	<i>ARNT</i>	Heterodimeriza con AhR para formar el complejo AhR/ARNT (Rowlands & Gustafsson, 1997)
<b>Factores involucrados en la represión de la señal de AhR</b>		
	<i>AHRR</i>	Regula negativamente la función de AhR al dimerizar con ARNT y unirse a XRE (Mimura, Ema, Sogawa, & Fujii-Kuriyama, 1999)
	<i>AIN1</i>	Se une a ARNT y disminuye su localización nuclear (Sadek et al., 2000)
	<i>ADPF</i>	Factor involucrado en la degradación proteasomal de AhR (Ma & Baldwin, 2002; Ma, Renzelli, Baldwin, & Antonini, 2000)

<b>Co-activadores, co-represores, factores remodeladores de la cromatina y factores de transcripción</b>	
<i>SRC-1, NCoA-2, p300/CBP, p/CIP</i>	Coactivadores con actividad HAT que interaccionan con AhR y/o ARNT y facilitan la activación transcripcional (Beischlag et al., 2002)
<i>RIP140</i>	Se une a AhR y aumenta la transcripción de genes con XREs (Kumar, Tarpey, & Perdew, 1999)
<i>SMRT, SHP</i>	Inhibe la actividad transcripcional del complejo AhR/ARNT (Klinge et al., 2001; Nguyen, Hoivik, Lee, & Safe, 1999)
<i>Brg-1</i>	Factor que modifica histonas dependiendo de actividad ATPasa y aumenta la transcripción mediada por el complejo AhR/ARNT (S. Wang & Hankinson, 2002)
<i>Med220, CDK8</i>	Subunidades del complejo mediador involucrado en la activación transcripcional por AhR/ARNT (S. Wang, Ge, Roeder, & Hankinson, 2004)
<i>PolII, TBP, TFIIB, TFIIF</i>	Componentes de la maquinaria general de transcripción que están directamente involucrados en la activación de genes diana de AhR.
<b>Fosforilación</b>	
<i>PKC</i>	Aumenta la activación transcripcional de AhR/ARNT dependiente de ligando. El mecanismo es desconocido (Minsavage, Park, & Gasiewicz, 2004).
<i>c-Src</i>	Tirosina quinasa asociada a AhR y que es activada por ligandos del receptor (Enan & Matsumura, 1996; Kohle et al., 1999)
<i>cAMP</i>	Produce la acumulación de AhR en el núcleo sin que éste interaccione con ARNT (Oesch-Bartlomowicz et al., 2005)
<b>Interacción con otros factores de transcripción y de señalización</b>	
<i>NF-1</i>	Factor de transcripción involucrado en la inducción del <i>Cyp1a1</i> por AhR mediante su interacción con la caja CAAT (H. P. Ko, Okino, Ma, & Whitlock, 1997)
<i>Sp1</i>	Aumenta la regulación de genes controlados por AhR/ARNT (Kobayashi, Sogawa, & Fujii-Kuriyama, 1996)
<i>ER<math>\alpha</math></i>	Interacciona funcionalmente con AhR en regulación génica (Matthews, Wihlen, Thomsen, & Gustafsson, 2005)
<i>NF-<math>\kappa\beta</math></i>	Interacción entre AhR y la subunidad p65 de NF- $\kappa\beta$ . La activación de NF- $\kappa\beta$ suprime la expresión de <i>Cyp1a1</i> (Tian et al., 1999)

<i>Rb</i>	Interacción directa entre Rb y AhR necesaria para la máxima inducción de <i>Cyp1a1</i> , sugiriendo un papel de coactivador para Rb (Barnes-Ellerbe, Knudsen, & Puga, 2004; Huang & Elferink, 2005; Marlowe, Knudsen, Schwemberger, & Puga, 2004)
<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	La hipoxia inhibe la actividad transcripcional de AhR por competición con ARNT (H. Park, 1999)
<i>Mybbp1a</i>	Se asocia con AhR y favorece la transactivación (Jones, Okino, Gonda, & Whitlock, 2002)
<i>Nedd8</i>	Interacciona con AhR aumentando su acumulación nuclear y su actividad transcripcional (Antenos, Casper, & Brown, 2002)

**Tabla I.1.** Relación de los factores que interaccionan con AhR o con el heterodímero AhR/ARNT y su efecto en la actividad del complejo transcripcional.

En ausencia de ligando exógeno, la mayor parte de AhR se localiza en el citoplasma, pero varios estudios han demostrado que una fracción apreciable de receptor es activamente transportada hasta el núcleo en un flujo constante (Ikuta et al., 2000; Richter, Tillitt, & Hannink, 2001). En este sentido, el ligando exógeno afectaría el proceso de transporte incrementando significativamente la fracción nuclear de AhR. De hecho, en células humanas HeLa, el 15-20% del total del receptor se encuentra localizado en el núcleo en ausencia de xenobióticos, donde dimeriza con ARNT y es transcripcionalmente activo (S. S. Singh, Hord, & Perdew, 1996). En fibroblastos murinos, se ha descrito que la localización intracelular de AhR depende de la densidad celular, siendo mayoritariamente nuclear a baja densidad y citoplasmática en condiciones de confluencia (J. Rey-Barroso et al., 2013)

En diferentes sistemas celulares se han identificado mecanismos que regulan la actividad y la localización de AhR en un contexto fisiológico carente de ligandos exógenos:

- El co-activador RIP140 aumenta la actividad de promotores regulados por AhR tanto en presencia como en ausencia de ligando exógeno (Kumar et al., 1999).

- Al inducir la suspensión de la expresión de Cyp1a1 en cultivos de queratinocitos (Sadek & Allen-Hoffmann, 1994) de células de hepatoma de ratón (Sadek & Allen-Hoffmann, 1994) y de fibroblastos C3H10T1/2 (Cho, Zheng, & Jefcoate, 2004), se incrementa la expresión de genes diana de AhR.
- El estado de fosforilación de AhR influye en su distribución celular entre núcleo y citoplasma (Ikuta, Kobayashi, & Kawajiri, 2004). Por otro lado, la proteína quinasa C (PKC) potencia su activación transcripcional inducida por TCDD (Berghard, Gradin, Pongratz, Whitelaw, & Poellinger, 1993; Carrier, Owens, Nebert, & Puga, 1992; Y.-H. Chen & Tukey, 1996).
- La inmunofilina XAP2 previene la translocación de AhR al núcleo (Pollenz & Buggy, 2006) por reducción en los niveles celulares de cAMP via fosfodiesterasa 2A (PDE2A) (de Oliveira et al., 2007).
- La actividad transcripcional de AhR es regulada por la inhibición del proteasoma en fibroblastos embrionarios (MEF) y en células de hepatoma de ratón Hepa-1 (Santiago-Josefat et al., 2001; J. Song et al., 2002), siguiendo un mecanismo que implica la activación de PKC dependiente del factor de transcripción ubícuo Sp1 (Santiago-Josefat & Fernandez-Salguero, 2003).
- El represor de AhR (AhRR, *AhR Repressor*) compite con el propio receptor para interaccionar con ARNT, generando así complejos AhRR/ARNT transcripcionalmente inactivos. La expresión de AhRR es regulada positivamente por AhR mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (Bernshausen, Jux, Esser, Abel, & Fritsche, 2006; Mimura et al., 1999).

#### **4- AhR en la fisiología celular**

Tras la constatación de la aparición temprana de AhR en la escala evolutiva, de su conservación proteica y de su expresión constitutiva en la mayoría de los tipos celulares (Hahn, Karchner, Shapiro, & Perera, 1997), se incrementó el interés en la investigación del papel homeostático de este receptor. El desconocimiento de buena parte de su biología llevó a considerarlo durante décadas como un receptor “huérfano” carente de ligando endógeno y de funciones fisiológicas.

Numerosas evidencias experimentales sugieren que AhR podría activarse por moléculas endógenas generadas por la propia fisiología celular. Candidatos potenciales descritos son ciertos metabolitos del triptófano (Bergander et al., 2003; Platten, Wick, & Van den Eynde, 2012; Wincent et al., 2009), flavonoides (Cunningham, Threadgill, Yu-Fang, Santostefano, & Safe, 1996), metabolitos del ácido araquidónico como la lipoxina A<sub>4</sub> (Ciolino, Wang, & Yeh, 1998; Schaldach, Riby, & Bjeldanes, 1999), la bilirrubina (Sinal & Bend, 1997), el 7-ceto-colesterol (Savouret et al., 2001) y la indirubina e índigo presentes en la orina (Adachi et al., 2001).

En la búsqueda de su papel fisiológico, se ha propuesto que AhR puede haber evolucionado como parte de un sistema inducible encargado de metabolizar sustancias lipofílicas presentes en la dieta, de manera que las dioxinas podrían estar mimetizando la función de ligandos endógenos que regulan procesos fisiológicos. De hecho, se ha observado que las dioxinas inducen cambios en proliferación y diferenciación de una gran variedad de tipos celulares (A. L. Blankenship, Suffia, Matsumura, Walsh, & Wiley, 1993; Knutson & Poland, 1980).

El papel fisiológico de AhR se apoya en un número creciente de observaciones experimentales:

- Está implicado en el desarrollo del hígado y del sistema vascular (Gonzalez & Fernandez-Salguero, 1998; Lahvis et al., 2000; Schmidt, Su, Reddy, Simon, & Bradfield, 1996; Zaher et al., 1998).
- Su ausencia provoca alteraciones patológicas en los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> en los sistemas vascular, hepático, reproductivo e inmune (Barbara D. Abbott et al., 1999; Benedict et al., 2000; P. Fernandez-Salguero et al., 1995; P. M. Fernandez-Salguero et al., 1997; Lund, Goens, Kanagy, & Walker, 2003; Rico-Leo et al., 2016; Sauzeau et al., 2011; Thackaberry, Gabaldon, Walker, & Smith, 2002).
- Existen secuencias XRE altamente conservadas en regiones promotoras de genes que regulan procesos fisiológicos (Klinge et al., 1999; Safe, Wang, Porter, Duan, & McDougal, 1998).
- Modula la señalización mediada por TGFβ y ácido retinoico *in vitro* tanto en cultivos de fibroblastos embrionarios como en hepatocitos primarios e *in vivo* en hígado de ratón (Andreola et al., 2004; Andreola et al., 1997; Corchero, Martin-Partido, Dallas, & Fernandez-Salguero, 2004; Elizondo et al., 2000b; Gomez-Duran, Mulero-Navarro, Chang, & Fernandez-Salguero, 2006; Santiago-Josefat, Mulero-Navarro, Dallas, & Fernandez-Salguero, 2004b).
- AhR interacciona directa o indirectamente con el control del ciclo celular y con otras rutas moleculares de señalización (Elferink, Ge, & Levine, 2001; Nebert et al., 2000; Phelan, Brackney, & Denison, 1998; Puga et al., 2002; C. Weiss, Kolluri, Kiefer, & Gottlicher, 1996).
- Tiene un papel relevante en el control de la morfología celular, la adhesión y la migración en fibroblastos de ratón (Carvajal-Gonzalez, Mulero-Navarro, et al., 2009; J. Rey-Barroso et al., 2013) y en queratinocitos en proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) inducido por TGFβ (Rico-Leo, Alvarez-Barrientos, & Fernandez-Salguero, 2013).
- Su ausencia resulta en un incremento de la migración epitelial y del cierre de heridas en ratón (Carvajal-Gonzalez, Roman, et al., 2009).

- Modula procesos de EMT a través del control de retrotransposones B1-SINE por un mecanismo en el que colaboran proteínas de la familia SNAIL (Roman, Benitez, Carvajal-Gonzalez, & Fernandez-Salguero, 2008; Sauzeau et al., 2011)
- Está implicado en la regulación del desarrollo y en la maduración de células germinales de testículo y ovario involucrando cambios en el metabolismo de piRNAs, proteínas de unión a piRNAs y elementos transponibles (Rico-Leo et al., 2016).
- Ejerce una función relevante en la regulación de células madre implicadas en la regeneración pulmonar (Morales-Hernandez et al., 2017) y en la carcinogénesis y regeneración hepáticas (Moreno-Marin et al., 2017).
- Regula diferenciación de células tumorales humanas activando la transcripción de retrotransposones *A/u* por mecanismos que implican la maquinaria de miRNAs (Morales-Hernandez et al., 2016) y cambios en la estructura tridimensional de la cromatina (González-Rico et al., 2020)

Este conjunto de observaciones evidencia, por lo tanto, que AhR juega un papel relevante en procesos fisiológicos y organogénicos.

Uno de los fenotipos mejor caracterizados que apoya el papel de AhR en la homeostasis celular, es la marcada patología hepática que presentan los ratones *AhR*<sup>-/-</sup>. El hígado de estos animales es de aproximadamente la mitad de tamaño que el de los ratones silvestres de la misma edad y género y presenta una acumulación de colágeno que resulta en fibrosis hepática alrededor de las triadas portales (Corchero et al., 2004; P. Fernandez-Salguero et al., 1995; Peterson, Hodgson, Fernandez-Salguero, Neumeister, & Gonzalez, 2000). Interesantemente, la fibrosis portal presente en ratones *AhR*<sup>-/-</sup> colocaliza con un incremento en la expresión tanto de TGFβ como de su proteína de localización en la matriz extracelular LTBP-1 (*Latent Transforming Growth Factor Binding Protein-1*) (Corchero et al., 2004; Santiago-Josefat & Fernandez-Salguero, 2003). Además, este fenotipo hepático aparece conjuntamente con una mayor proliferación de vasos sanguíneos en la zona portal y en ciertas áreas del parénquima (P. M. Fernandez-Salguero et al., 1997), así como con la falta de resolución de la conexión porto-sistémica en ratones



adultos (Harstad, Guite, Thomae, & Bradfield, 2006; Lahvis et al., 2005).

Un número creciente de estudios sugieren posibles nuevas rutas con las que la señalización mediada por AhR podría interaccionar. Caben ser destacadas las reguladas por el receptor de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ), retinoblastoma (pRb) (Elferink et al., 2001), la quinasa c-Src, el factor de respuesta a hipoxia HIF-1 $\alpha$  (Nie, Blankenship, & Giesy, 2001) y el factor implicado en inflamación NF-K $\beta$  (Tian, Rabson, & Gallo, 2002). Adicionalmente, se ha sugerido que, al menos en ciertos tipos celulares, AhR alcanza su máximo nivel de actividad transcripcional tras ser fosforilado (Gradin, Whitelaw, Toftgard, Poellinger, & Berghard, 1994). Diversos estudios atribuyen al proceso de fosforilación un papel potenciador de la actividad transcripcional de AhR en presencia de ligando exógeno (S. Park, Henry, & Gasiewicz, 2000). En este sentido, se ha propuesto que AhR interacciona con rutas de señalización mediadas por la quinasa c-Src (A. Blankenship & Matsumura, 1997; Vogel & Matsumura, 2003) y que participa en el control de la actividad de fosfatasa y quinasas en hepatocitos (Ashida, Nagy, & Matsumura, 2000).

A nivel de procesos, el interés en el campo se centra en buena medida en analizar la interacción del receptor con vías de señalización que controlan proliferación, ciclo celular, adhesión y migración, diferenciación, pluripotencia y reprogramación. A nivel orgánico y de sistemas, existe una intensa actividad investigadora con respecto a los sistemas inmunitario, hepático, cardiovascular, vascular y reproductivo. Esfuerzos adicionales se llevan a cabo para tratar de comprender aspectos nuevos de la biología de AhR, como son su participación en metabolismo, senescencia y regeneración de tejidos.

## 5- AhR en pluripotencia y diferenciación

Las células madres embrionarias tienen la capacidad de dar lugar a todos los linajes celulares para generar un organismo completo y funcional. Esta capacidad inicial se denomina totipotencia y se va restringiendo a lo largo del desarrollo embrionario a medida que se comprometen los distintos destinos celulares.

La diferenciación celular en mamíferos consiste en la reprogramación genética de las células madre mediante un proceso coordinado de activación y represión de patrones de expresión génica, para dar lugar a una célula finalmente diferenciada. Gracias al establecimiento de líneas de células madre embrionarias murinas y humanas, se han identificado los genes responsables del mantenimiento de la pluripotencia, codificando la mayor parte de ellos para factores de transcripción. En los últimos años se ha descubierto, no con poca sorpresa, que la diferenciación celular es un proceso reversible, demostrándose que la combinación de varios de estos factores de pluripotencia (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog y LIN28) es capaz de convertir fibroblastos adultos en células madre pluripotentes (*iPSCs, induced Pluripotent Stem Cells*) (Radziskeuskaya & Silva, 2014; Takahashi & Yamanaka, 2006). Oct4, Sox2 y Nanog constituyen el núcleo de la red transcripcional que regula el mantenimiento de la pluripotencia y la auto-renovación de las células madre embrionarias y mesenquimales (Do et al., 2013; Jaenisch & Young, 2008). Estudios iniciales mostraron que Oct4 y Sox2 co-regulan sus propios genes, así como otros que codifican factores de pluripotencia incluyendo *Nanog*, *Fgf4* y *Utf1* (Ambrosetti, Scholer, Dailey, & Basilico, 2000; Catena et al., 2004; Chew et al., 2005; Nishimoto, Fukushima, Okuda, & Muramatsu, 1999; Okumura-Nakanishi, Saito, Niwa, & Ishikawa, 2005; Rodda et al., 2005).

La implicación de AhR en la diferenciación celular ha sido descrita en diferentes trabajos previos. En estudios iniciales en los que se utilizó éster de forbol para inducir la diferenciación de células HELA a monocitos, se observó que este proceso requería la

activación transcripcional de AhR (Hayashi, Okabe-Kado, Honma, & Kawajiri, 1995). En experimentos destinados a diferenciar fibroblastos embrionarios procedentes de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> a adipocitos, se observó que la carencia de AhR alteró su diferenciación, indicando que AhR podría ser un regulador temprano de la adipogénesis (Alexander et al., 1998). Por otro lado, el tratamiento de ratas hembras preñadas con el ligando exógeno TCDD, aceleró la diferenciación durante la organogénesis del embrión (A. L. Blankenship et al., 1993), sugiriendo que AhR promueve diferenciación *in vivo*. Más recientemente, se ha demostrado que la activación de AhR por TCDD durante el desarrollo embrionario de ratón bloquea la capacidad de las células madre hematopoyéticas (***Hematopoietic Stem Cells***, HSC) para la autorrenovación a largo plazo (Laiosa, Tate, Ahrenhoerster, Chen, & Wang, 2015). Más aún, la activación sostenida de AhR durante la diferenciación temprana de células madre embrionarias de ratón, compromete la señalización crítica para la ontogenia del mesodermo cardíaco y de las funciones de cardiomiocitos (Q. Wang et al., 2015). Análisis de genoma completo tras inmunoprecipitación de cromatina (***Chromatin Immunoprecipitation***, ChIP) (***Genome-wide ChIP***) de células de carcinoma hepatocelular procedentes de ratones silvestres (*AhR*<sup>+/+</sup>) y *AhR*<sup>-/-</sup>, permitieron identificar varios grupos de genes implicados en diferenciación celular y desarrollo regulados directamente por AhR (Sartor et al., 2009). Conjuntamente, estos y otros estudios han permitido demostrar la implicación de AhR en la diferenciación del sistema inmune, la piel, el epitelio intestinal o el epitelio pulmonar (Esser & Rannug, 2015). De hecho, han concluido que AhR es necesario para la correcta diferenciación de linfocitos Th17 y linfocitos T reguladores (Treg) por mecanismos que son tanto dependientes como independientes de su unión a elementos XRE (Esser, Rannug, & Stockinger, 2009; Mezrich et al., 2010; Quintana et al., 2008; Veldhoen, Hirota, Christensen, O'Garra, & Stockinger, 2009). Interesantemente, se ha observado que AhR coopera con el factor inducible de hipoxia HIF-1 $\alpha$  en la diferenciación de células T reguladoras tipo 1 (Tr1) a través de su reprogramación metabólica (Mascanfroni et al., 2015). El tratamiento de queratinocitos primarios de ratón con los antagonistas de AhR CH223191 y GNF351 comprometió su diferenciación terminal, mientras que el análisis transcriptómico comparado de queratinocitos aislados de ratones

*AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> mostró una reducción en la expresión de genes de diferenciación en ausencia de AhR (van den Bogaard et al., 2015). Se ha comprobado que AhR participa en la diferenciación de células de neuroblastoma *in vivo*, manteniendo una correlación inversa con el marcador pronóstico MYCN (P.-Y. Wu et al., 2014). En células de leucemia humana HL60, los niveles de AHR aumentan durante la diferenciación, mientras que los del marcador de células madre OCT4 disminuyen, indicando que la regulación positiva de AHR en células de leucemia favorece un fenotipo diferenciado (Ibabao, Bunaciu, Schaefer, & Yen, 2015). Aunque AhR actúa como un factor de diferenciación en la mayoría de los tipos celulares investigados, un estudio reciente ha indicado que su activación por TCDD puede inhibir la proliferación y la diferenciación de células pre-osteoblásticas murinas MC3T3-E1 de una manera concentración dependiente, y que el pretratamiento con el antagonista CH223191 restablece el potencial de diferenciación de dichas células (H. Yu et al., 2014). Estos estudios concluyen, por tanto, que AhR tiene efectos dependientes del tipo celular en diferenciación, de manera similar a como sucede en proliferación y migración (Pohjanvirta, Miettinen, Sankari, Hegde, & Linden, 2012).

Trabajos recientes de nuestro laboratorio apoyan la función de AhR como un importante regulador del balance entre pluripotencia y diferenciación en condiciones fisiológicas así como en células transformadas. De entre ellos, destaca el hallazgo de que este receptor regula diferenciación de células murinas y humanas no sólo empleando su función como regulador transcripcional, sino también modulando tanto la dinámica de la cromatina como la transcripción de elementos genéticos móviles. Estudios iniciales identificaron un nuevo retrotransposón de la subfamilia B1-SINE (llamado B1-X35S), ampliamente representado en el genoma de ratón y particularmente enriquecido en regiones promotoras génicas (Roman et al., 2008). B1-X35S es una secuencia conservada retrotransponible que alberga sitios de unión para AhR (XRE). Observamos que AhR puede reprimir la expresión de genes implicados en diferenciación, a través de estos elementos, mediante un mecanismo que implica la transcripción de sus RNAs no codificantes por las RNA polimerasas II y III (Roman et al., 2011). Estudios posteriores con células de

carcinoma embrioide humano NTERA-2, mostraron que su diferenciación hacia linaje neural tras estimulación con ácido retinoico (RA) resultó en un marcado aumento en los niveles y en la activación transcripcional de AHR así como en la represión de los genes de pluripotencia *OCT4* y *NANOG*. Por el contrario, el silenciamiento de AHR restableció la expresión de *OCT4* y de *NANOG*, haciendo a las células NTERA-2 refractarias a la diferenciación por ácido retinoico (Morales-Hernandez et al., 2016). Resulta relevante para el mecanismo que ambos genes, *NANOG* y *OCT4*, contienen retrotransposones *Alu* (hererólogos a los B1-SINE murinos) en sus promotores, los cuales a su vez transportan sitios XRE activos. Mostramos que AhR reprime transcripcionalmente la expresión de estos genes de pluripotencia por un mecanismo que implica su unión al sitio XRE presente en el elemento *Alu* y la transcripción de éste por la RNA polimerasa III. El RNA no codificante (*non-coding RNA*, ncRNA) generado resulta ser complementario a la región 3'UTR (**Un**Translated **R**egion, UTR) de los mRNAs de *NANOG* y *OCT4*. Finalmente, los ncRNAs derivados de los elementos *Alu* se incorporan en la maquinaria de degradación de micro-RNAs (miRNAs) reduciéndose los niveles de mRNA de ambos genes e induciéndose diferenciación celular (Morales-Hernandez et al., 2016). Interesantemente, la unión de AhR a los retrotransposones *Alu* localizados en *OCT4* y *NANOG*, induce la formación de un bucle en la cromatina que aísla a cada uno de ellos induciendo su represión y la diferenciación de las células NTERA-2 humanas (González-Rico et al., 2020). Por lo tanto, es probable que AhR regule y/o coordine la represión de *OCT4* y de *NANOG* en células diferenciadas reduciendo el nivel de sus mRNAs vía maquinaria de miRNAs y cambios en la dinámica de la cromatina nuclear.

AhR también está implicado en procesos de indiferenciación (*Stemness*). Se ha mostrado que su expresión se encuentra transcripcionalmente reprimida en células madre embrionarias por vías de señalización que implican a los factores de pluripotencia Oct3/4, Nanog, Sox2 y proteínas Polycomb (C. I. Ko, Wang, Fan, Xia, & Puga, 2014). Así, el fármaco antialérgico tranilast puede revertir diferenciación y promover la reprogramación de fibroblastos embrionarios de ratón a células madre pluripotentes inducidas (*induced-*

*Pluripotent Stem cells*, iPS) por la modulación del microRNA miR-302 a través de AhR (Hu, Zhao, & Pei, 2013). Adicionalmente, se ha sugerido que es necesaria la represión de AhR para mantener la progresión mitótica de células madre embrionarias y para prevenir la pérdida prematura de pluripotencia (C. I. Ko et al., 2016).

En células madre humanas, el aumento de actividad de los retrotransposones *Alu* genera daño en el DNA, pérdida de reparación eficiente y senescencia; por el contrario, la represión de estos elementos transponibles invierte el fenotipo senescente y rescata tanto la proliferación como la expresión de reguladores de pluripotencia (J. Wang et al., 2011). Resulta bastante probable que exista un vínculo entre AhR y la diferenciación celular a través de la regulación de elementos transponibles.

AhR también parece tener un papel relevante en la regulación de subpoblaciones residentes (*pool*) de células madre y en la auto-renovación de tejidos. La ausencia de AhR produce un agotamiento prematuro y cambios aberrantes en las células madre hematopoyéticas, resultando en un trastorno mieloproliferativo en ratones envejecidos (K. P. Singh et al., 2014). Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que la depleción del receptor en ratón produce un fenotipo más indiferenciado en varios órganos, acelerando y favoreciendo el potencial regenerativo en pulmón (Morales-Hernandez et al., 2017) y en hígado (Moreno-Marin et al., 2017). La mejora regenerativa en ambos órganos cursa por un aumento en la población de células progenitoras indiferenciadas (Clara, neuroepiteliales y basales en pulmón; CK1+, TBX+ y  $\beta$ -cat+ en hígado) concurrente con un *pool* basal más elevado de células Oct4+ y Nanog+ en ratones *AhR*<sup>-/-</sup> que en *AhR*<sup>+/+</sup>.

La marcada importancia que tiene el balance entre diferenciación y pluripotencia en el desarrollo de numerosas patologías, hace que sea especialmente relevante el dilucidar el papel de los intermediarios moleculares que regulan estos procesos. Los estudios llevados a cabo en el nuestro, y en otros grupos de investigación, demuestran que AhR tiene un importante papel en la regulación de la diferenciación. El uso de

modelos experimentales humanos y murinos, en los que se ha interferido la expresión del receptor, corroboran la indispensabilidad de AhR en los mecanismos de diferenciación celular. De este modo, los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> muestran, en los tejidos y órganos analizados, un fenotipo más indiferenciado y, en definitiva, un estado basal más pluripotente, lo que probablemente tenga como consecuencia, entre otras aún por identificar, una más efectiva capacidad regenerativa.

## **6- Papel de AhR en cáncer**

El hecho de que AhR tenga una contribución relevante en el control de la diferenciación y la pluripotencia en condiciones fisiológicas, indica que su función puede ser igualmente importante en aquellas patologías relacionadas con la desregulación de estos procesos, tales como el cáncer.

La relación entre el receptor AhR y el cáncer se puso de manifiesto por estudios experimentales y epidemiológicos (Androutsopoulos, Tsatsakis, & Spandidos, 2009; Gasiewicz, Henry, & Collins, 2008), en los que se observó que la exposición a hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) estuvo relacionada con una gran variedad de cánceres en animales de experimentación y en humanos, en buen parte implicando la participación de AhR (Morris, Tryson, & Wu, 2000; Puga, Ma, & Marlowe, 2009). La exposición a ligandos de AhR está asociada con el desarrollo de leucemias en humanos (Casado, Singh, & Gasiewicz), mientras que el tratamiento con PAHs origina carcinomas pulmonares en ratones silvestres pero no en aquellos que carecen de expresión del receptor (Matsumoto et al., 2007). Este papel de AhR en carcinogénesis inducida por xenobióticos puede explicarse en base a su capacidad para inducir la expresión de enzimas detoxificantes que pueden activar carcinógenos e iniciar el proceso tumoral. No obstante, AhR puede promover o inhibir progresión tumoral en ausencia de xenobióticos dependiendo del fenotipo de la célula diana. Con respecto a su función oncogénica, en un

panel de líneas celulares de cáncer de mama la activación de AhR por ligando exógeno bloqueó su potencial metastático, generando un fenotipo menos invasivo, mientras que su inhibición rescató la capacidad metastática, sugiriendo que la diferenciación inducida por AhR podría ser una herramienta para el tratamiento del cáncer de mama (Hall et al., 2010). Existen también evidencias del papel de AhR en hepatocarcinogénesis. Se ha demostrado que el hexaclorobenceno (HCB) induce la expresión de AhR en focos preneoplásicos de hígado de rata y en células de hepatocarcinoma humano HepG2 (de Tomaso Portaz et al., 2015). La activación de AhR está asociada con la inhibición de los contactos célula-célula en células de hígado WBF344, lo que sugiere que podría contribuir a la generación de metástasis hepáticas (Kohle et al., 1999; C Weiss et al., 2008). En humanos, AhR se encuentra sobreexpresado en tumores de mama (Korzeniewski, Wheeler, Chatterjee, Duensing, & Duensing; Yang et al., 2008), estómago (T. L. Peng et al., 2009), linfomas T (Hayashibara et al., 2003) y páncreas (Koliopanos et al., 2002), así como en líneas celulares aisladas de tumores cerebrales (Dever & Opanashuk, 2012; Gramatzki et al., 2009). En cuanto a su potencial como supresor tumoral, nuestros resultados han revelado que su silenciamiento estable en células de melanoma de ratón B16F10 aumenta significativamente la tumorigénesis primaria y su capacidad metastásica hacia pulmón. Por el contrario, su activación constitutiva bloquea marcadamente ambos procesos (M. Contador-Troca et al., 2013). Estudios posteriores mostraron que el papel protumoral y prometastático que ejerce la ausencia de AhR está asociado a la activación del inductor de pluripotencia SOX2 y de la enzima aldehído deshidrogenasa 1A1 (ALDH1A1) (María Contador-Troca et al., 2015). AhR se encuentra reprimido en tumores con inactivación de pRb (L. Peng, Mayhew, Schnekenburger, Knudsen, & Puga, 2008) y en tumores gástricos inducidos por tratamiento con nitroso-hidroxibutiril-amina (Iida et al., 2010). Además, se han hallado evidencias de la represión de AhR en biopsias de pacientes de cáncer de próstata (Gluschnaider et al., 2010) y de leucemia linfoblástica aguda, en la que los niveles de AHR se encuentran reprimidos por hipermetilación de su promotor (Mulero-Navarro et al., 2006). En nuestro grupo, hemos mostrado también que células de teratocarcinoma embrioide humano NTERA-2, interferidas para AhR, generan tumores con mayores niveles



de marcadores de ecto-, meso- y endodermo que aquellas que expresan receptor activo (Morales-Hernandez et al., 2016).

La participación de AhR en cáncer puede estar mediada por diversos mecanismos. El receptor AhR participa en diferentes vías de señalización esenciales para la regulación del ciclo celular (Casado et al.; Gasiewicz et al., 2008). Así, este receptor interacciona funcionalmente con CDK4 y CCND1 en líneas de cáncer de mama (Barhoover, Hall, Greenlee, & Thomas), modula los niveles de activación de retinoblastoma (pRb) y puede interaccionar con p53 (Su, Lin, Wang, & Chang, 2009). En células de hepatocarcinoma humano HepG2; su activación por el ligando exógeno TCDD contrarresta la actividad de p53 (Ambolet-Camoit et al.) por un mecanismo dependiente del ER $\alpha$  y HDM2 (Seifert, Taubert, Hombach-Klonisch, Fischer, & Navarrete Santos, 2009). Es probable, por tanto, que la activación de AhR por ligandos exógenos contribuya a la progresión tumoral vía inhibición de p53.

AhR desempeña también un papel relevante en el mantenimiento del contacto célula-célula, cuya pérdida es fundamental para el potencial invasivo y la diseminación tumoral. AhR regula transcripcionalmente el factor de transcripción e inductor de EMT Snai2/Slug, el cual reprime la proteína de uniones adherentes E-cadherina y da lugar a la pérdida de contactos intercelulares y a un aumento de motilidad celular (Ikuta & Kawajiri, 2006; Ikuta, Namiki, Fujii-Kuriyama, & Kawajiri, 2009). Sin embargo, el silenciamiento estable de AhR en células epiteliales induce un fenotipo EMT que se ve potenciado por la activación de la señalización dependiente de TGF- $\beta$  (Rico-Leo et al., 2013), por cambios en los niveles de elastasa y del complejo plasminógeno/plasmina (Gomez-Duran et al., 2006) y por la activación de la metaloproteasa de matriz extracelular MMP2 (Mulero-Navarro et al., 2005; Santiago-Josefat, Mulero-Navarro, Dallas, & Fernandez-Salguero, 2004a).

La implicación de AhR en procesos apoptóticos resulta también relevante en su función en cáncer. El tratamiento con el ligando TCDD induce la pérdida de la respuesta apoptótica en células de linfoma por incremento en los niveles de cicloxigenasa-2 (COX2) y

por desregulación de genes de la familia Bcl2 (Vogel et al., 2007). Por el contrario, la exposición de células de hepatoma murino Hepa1c1c7 a *N*-acetil-esfingosina inhibe la proliferación celular e induce apoptosis (Caruso et al., 2004).

AhR está también implicado en vasculogénesis y en angiogénesis tumoral. Respecto al primero de estos procesos, los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> tienen alteraciones en el sistema vascular que da lugar a fibrosis hepática y a la persistencia de un *shunt* porto-sistémico en adultos que probablemente es reponsable de su hipertrofia cardíaca e hipertensión (P. M. Fernandez-Salguero et al., 1997; Lahvis et al., 2000; Lahvis et al., 2005; Sauzeau et al., 2011). Respecto al segundo, los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> muestran una deficiente respuesta angiogénica (Maltepe, Schmidt, Baunoch, Bradfield, & Simon, 1997) que compromete el desarrollo tumoral en modelos experimentales de *xenografts* (Roman, Carvajal-Gonzalez, Rico-Leo, & Fernandez-Salguero, 2009) muy probablemente por una deficiente producción de VEGF (**V**ascular **E**ndotelial **G**rowth **F**actor) por parte el endotelio y de TGFβ por el estroma tumoral (Roman et al., 2009).

Resulta, por tanto, que AhR participa en la regulación de numerosas vías de señalización críticas para el mantenimiento de la homeostasis celular. Consecuentemente, la desregulación de su actividad tiene importantes implicaciones en varias patologías, incluyendo el cáncer. Una cantidad creciente de estudios en modelos *in vitro* e *in vivo*, tanto animales como humanos, así como en pacientes, demuestran que AhR tiene funciones relevantes en desarrollo y metástasis tumoral. En este sentido, es razonable pensar que AhR puede ser un posible marcador diagnóstico y pronóstico en cáncer y, eventualmente, una diana terapéutica. Por ello, es especialmente importante caracterizar el papel del receptor en aquellos tipos de cáncer de alta incidencia dónde se hace necesaria la búsqueda de nuevos marcadores.

**Tabla I.2. Referencias sobre el papel dual de AhR en cáncer.**

<b>AhR PROTEÍNA ONCOGÉNICA</b>	<b>AhR SUPRESOR TUMORAL</b>
Células de hepatoma deficientes en la expresión de AhR (AhR-D) tienen un tiempo de replicación alargado por el bloqueo de la transición G1/S (Ma & Whitlock, 1996).	Ligandos de AhR disminuyen la proliferación de células de páncreas y de próstata (Koliopanos et al., 2002) (Jana et al., 1999).
Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) procedentes de ratones AhR-/- presentan un mayor tiempo de duplicación (Elizondo et al., 2000a).	Células 5L de hepatoma de rata sufren parada de ciclo celular en la transición G1/S tras la activación de AhR por xenobióticos rata (Ge & Elferink, 1998; Kolluri et al., 1999; Puga et al., 2002).
AhR se encuentra sobre-activado en células T de leucemia adulta humana (Hayashibara et al., 2003).	La expresión constitutiva de AhR induce apoptosis en células T Jurkat por bloqueo del ciclo celular en G1 (Ito et al., 2004).
La activación constitutiva de AhR incrementa la frecuencia de hepatocarcinogénesis en ratones transgénicos B6C3F1 (Moennikes et al., 2004).	La expresión de AhR se encuentra reprimida epigenéticamente por hipermetilación de su promotor en células de leucemia linfoblástica aguda y de leucemia mieloide crónica (Mulero-Navarro et al., 2006).
La depleción de AhR en células de cáncer de mama humanas altera la expresión de genes en rutas regulatorias claves en cáncer promoviendo progresión tumoral (Goode, Pratap, & Eltom, 2014).	AhR reprime de manera constitutiva la expresión del oncogén c-Myc en líneas tumorales de glándula mamaria (Yang et al., 2005).
AhR está sobre-expresado en meningiomas humanos (Talari, Panigrahi, Madigubba, & Phanithi, 2018).	La expresión de AhR en células de melanoma suprime el crecimiento tumoral y los niveles de AhR se encuentran significativamente reducidos en melanomas humanos con respecto a nevi (M. Contador-Troca et al., 2013).
La ausencia de AhR acelera la regeneración del epitelio pulmonar (Morales-Hernandez et al., 2017).	La ausencia de AhR aumenta la progresión de tumores hepáticos inducidos por dietilnitrosamina (DEN) (Moreno-Marin et al., 2017).

.

# MATERIALES Y MÉTODOS



### 1. Modelos animales.

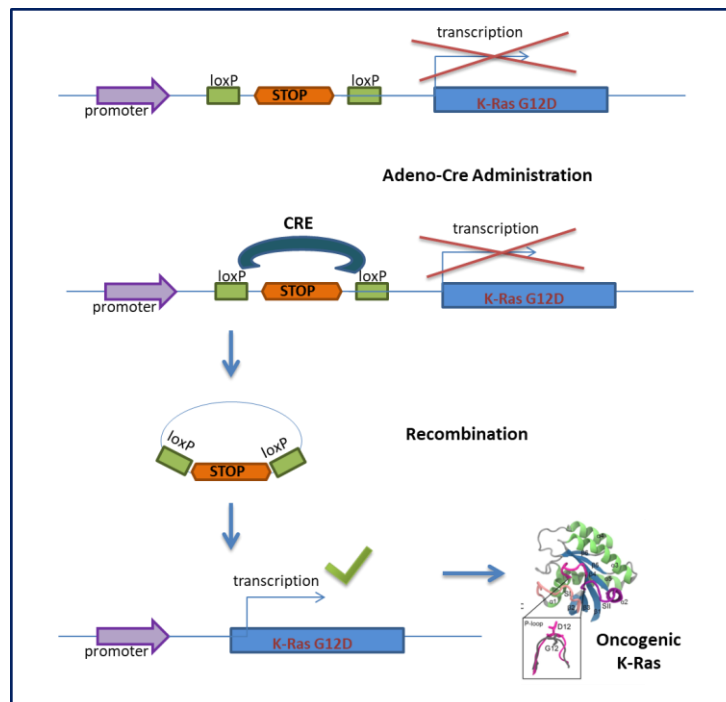
#### 24.1- Modelo murino AhR knock-out

Los ratones mutantes para AhR (*AhR*<sup>-/-</sup>), así como los de tipo silvestre (*AhR*<sup>+/+</sup>) utilizados son del fondo genético mixto C57BL6/N x 129/Sv. Ambas líneas fueron producidas por recombinación homóloga en células embrionarias (ES) como se ha descrito previamente (P. Fernandez-Salguero et al., 1995). El gen de resistencia a neomicina fue insertado sustituyendo el primer exón del locus de AhR, interrumpiendo el marco de lectura e impidiendo por tanto la expresión del receptor.

#### 24.2- Modelo murino K-Ras G12D K-Ras<sup>LSL-G12D</sup>/+

Los ratones transgénicos K-Ras<sup>LSL-G12D/+</sup> fueron amablemente cedidos por el laboratorio del Dr. Xosé Bustelo (Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca) en base a la colaboración que hemos establecido con su grupo. Estos ratones tienen integrada la forma mutada G12D del oncogén K-Ras humano la cual es prevalente en tumores de diferente etiología. Esta mutación puntual cambia la glicina de posición 12 por un aspártico ocasionando un cambio conformacional que da lugar a una proteína constitutivamente activa con capacidad para inducir transformación tumoral. Dicha mutación se encuentra en heterocigosis y su activación puede realizarse de manera condicional empleando la metodología LoxP-Cre. Estos animales fueron cruzados con nuestra línea de ratones *AhR*<sup>-/-</sup> y *AhR*<sup>+/+</sup> y las generaciones resultantes fueron

genotipadas por PCR para detectar la presencia conjunta del alelo K-Ras G12D en heterocigosis y AHR-null en homocigosis. Generamos de este modo las líneas K-Ras<sup>LSL-G12D/+</sup>/AhR<sup>-/-</sup> y K-Ras<sup>LSL-G12D/+</sup>/AhR<sup>+/+</sup>. Este modelo se utilizó para investigar si la ausencia de expresión de AhR potencia algún aspecto del desarrollo de tumores originados por esta mutación en el oncogén K-Ras humano. Para controlar la inducción de K-RasG12D, se insertó el casete LSL en el primer intrón del gen K-Ras. Este casete consiste en elementos de parada transcripcionales y traduccionales flanqueados por sitios LoxP. En ausencia de actividad Cre recombinasa, las señales de parada del casete LSL impiden la expresión del oncogén; la adición de Cre elimina dicha señales permitiendo la expresión del oncogén dirigida por el promotor integrado en el vector (Tuveson et al., 2004). Es importante tener en cuenta que los ratones homocigóticos K-Ras<sup>LSL-G12D/G12D</sup> no son viables y mueren en útero, por lo que la mutación debe mantenerse en sólo uno de los alelos (Figura M1).



**Figura M1.** Esquema de la construcción de un vector de transgénesis condicional que permite la expresión del alelo mutado K-Ras<sup>LSL-G12D</sup> por la acción de la recombinasa Cre.



### 24.3- Modelo murino p16-3MR

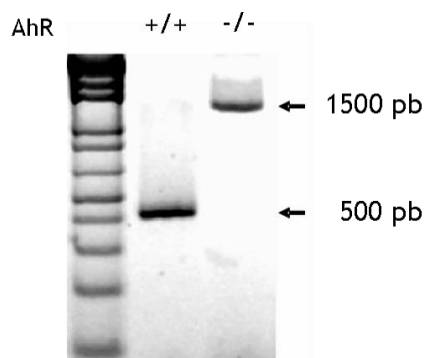
Los ratones transgénicos p16-3MR fueron utilizados en el laboratorio de la Dra. Judit Campisi (Buck Institute, California, EEUU) durante la estancia allí realizada. Este modelo animal fue generado según se describe en (Demaria et al., 2014). La proteína p16-3MR permite eliminar selectivamente las células senescentes mediante un dominio herpesvirus-tirosina quinasa. El tratamiento con ganciclovir (GCV), un análogo de nucleósido que tiene alta afinidad por HSV-TK (*Herpes Simplex Virus-Thymidine Kinase*) pero baja afinidad por la proteína TK celular, hace que, tras su unión, el HSV-TK se transforme en un terminador de cadena de ADN tóxico. En las células senescentes que no se dividen, el GCV fragmenta el ADN mitocondrial, causando la muerte de las mismas por apoptosis (Laberge et al., 2013).

Todos los experimentos con animales fueron desarrollados de acuerdo con la legislación europea (Directiva de la EU 86/609/CEE modificada por la directiva 2003/65/CE) y con la legislación Nacional (Real decreto RD53/2013) y siguiendo las normas del Instituto para los Recursos en Animales de Experimentación (ILAR). Los protocolos experimentales empleados en esta Tesis Doctoral fueron aprobados por el Comité de Bioética para la Experimentación Animal de la Universidad de Extremadura (protocolo 109/2014) y por la Junta de Extremadura (expediente EXP-20160506-1).

## 2. Genotipado.

El genotipo de los ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> se realizó por PCR empleando DNA genómico extraído de una biopsia de la cola de animales adultos. Para extraer el DNA, el

tejido se incubó con tampón de extracción de DNA genómico<sup>1</sup> durante 16 h a 55°C. A continuación, el DNA se precipitó añadiendo un volumen de 2-isopropanol. Tras un lavado en 500 µl de 2-isopropanol al 80% (v/v), el DNA se dejó secar y se resuspendió en 100 µl de tampón TE<sup>2</sup>. Este DNA se utilizó como molde en una reacción de PCR con unos oligonucleótidos (WT2 + WT5) que hibridan en las secuencias flanqueantes a la región en la que el gen de AhR fue inactivado por inserción del gen de resistencia a neomicina (Neo) (Tabla M.1) (P. Fernandez-Salguero et al., 1995). De este modo, el análisis de los productos de PCR generados permite detectar un fragmento de 1500 pb en el caso del alelo mutado y de 500 pb cuando se trata del alelo silvestre (**Figura M2**).



**Figura M2.** Fragmentos de PCR correspondientes al genotipado de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup>. El genotipo silvestre corresponde a una banda de 500 pb mientras que el mutante corresponde a una banda de 1500 pb.

<sup>1</sup> **Tampón de extracción de DNA genómico:** Tris-HCl 100 mM pH 8.5, EDTA 5 mM, SDS 0,2% (p/v), NaCl 200 mM, Proteinasa K 100 µg/ml.

<sup>2</sup> **TE:** Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM.

El genotipado de los animales K-Ras G12D se llevó a cabo empleando DNA genómico de biopsias de la cola según se ha indicado anteriormente. Además de identificar el genotipo de AhR, se llevo un segundo análisis por PCR para detectar la mutación K-Ras G12D. Para ello, utilizamos un oligonucleótido *reverse* que hibrida específicamente en el casete que permite controlar la expresión de la versión mutada del gen. El alelo silvestre se analizó empleando un oligonucleótido *reverse* específico para dicho alelo. En ambas reacciones de PCR se empleó un oligonucleótido *forward* común. La presencia del alelo KRas<sup>LSL-G12D</sup> se identificó por la amplificación de la banda correspondiente al utilizar el oligonucleótido *reverse* específico (**Tabla M1**).

Oligonucleótido	Secuencia <i>primer</i> 5' ---> 3'	PCR (combinación <i>primers</i> )	Fragmento pb	Condiciones de PCR
3'-universal	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	3'-universal + 5'- mutante	500pb	95°C 30'' 60°C 90'' 72°C 1'
5'-mutante	GGAGCGGGAGAAATGGATATG			
5' <i>wildtype</i>	GCGAAGAGTTTGCCTCAACC	3'-universal + 5'- <i>wild type</i>	500pb	
WT2	GGCTAGCGTGCGGGTTTCTC	WT2+WT5	500pb (WT)	95°C 1'
WT5	CTAGAACGGCACTAGGTAGGTCAG		1500pb (KO)	56°C 1' 72°C 3'

**Tabla M.1.** Secuencia de los *oligonucleótidos* y condiciones de genotipado para los ratones conteniendo la mutación K-Ras G12D.

### 3. Obtención de embriones preimplantacionales

#### 24.4- Tratamiento hormonal y apareamiento

Para la obtención de embriones, utilizaron ratones hembra *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> de entre 4 y 6 semanas mantenidos en un ciclo de luz/oscuridad 12/12. Los animales se sometieron a un tratamiento hormonal para mejorar la ovulación y aumentar el número de ovocitos producidos. Para ello, se inyectaron i.p. 7,5 U de PMSG (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*) con la finalidad de inducir el desarrollo folicular en los ovarios y, 48 horas más tarde, se les administraron i.p. 7,5 U de hCG (*human Chorionic Gonadotropin*), para estimular la ovulación. Transcurridas 8 horas del tratamiento hormonal se establecieron los apareamientos. A la mañana siguiente, se comprobó la presencia de *plug* vaginal (tapón vaginal) con el fin de determinar si se produjo apareamiento.

#### 24.5- Aislamiento de embriones

Una vez comprobado que el apareamiento tuvo lugar, las hembras que presentaron *plug* fueron sacrificadas a diferentes tiempos según el estadio de desarrollo embrionario requerido para el experimento (*dpc: días post coitum*):

- 0.5 dpc: 1 célula
- 1.5 dpc: 2 células
- 2 dpc: 4-8 células
- 2.5 dpc: mórula
- 3.5dpc: blastocisto

Una vez sacrificadas las hembras, se realizó una incisión abdominal para extraer útero, oviductos y ovarios. Los órganos se dispusieron en una placa de Petri con PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) y se diseccionaron utilizando unas microtijeras para separar los hemiúteros de oviductos y ovarios. A continuación, con la ayuda de una jeringa, se llevó a cabo el lavado de los oviductos (1,5-2,5 dpc) y hemiúteros (2,5-3,5 dpc) con PBS para liberar los embriones, que fueron recolectados y posteriormente manejados con la ayuda de un *striper* (*Origio*).

#### 4. Cultivo primario de fibroblastos de la cola: Tail Tips Fibroblasts (TTFs)

Los fibroblastos primarios de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> se obtuvieron a partir de la punta de la cola y de las orejas de los animales adultos. Tras ser sacrificados, se seccionaron biopsias de los últimos 3 cm de la cola y de las orejas. Los tejidos se limpiaron y esterilizaron empleando secuencialmente PBS y etanol al 70%. Posteriormente se dejaron secar en la campana de flujo laminar y con la ayuda de pinzas y bisturí se seccionaron en pequeños fragmentos que se disgregaron por agitación a 200 rpm y 37°C durante 90 min en PBS conteniendo tripsina al 0,25% (p/v) (*Invitrogen*). Tras la incubación en tripsina, con la finalidad de obtener una suspensión celular homogénea, el disgregado se pasó a través de filtros de 40 µm sobre placas de 60 mm y se añadieron lentamente 3 ml de medio RPMI. Se retiraron los filtros y la suspensión celular obtenida se centrifugó durante 5 min a 200 x g. El precipitado de células se sembró en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 2-mercaptoethanol 50 µM, NEAA (Gibco) y penicilina/estreptomicina al 1% en placas de 60 mm a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. En este momento, se consideró que los fibroblastos se encuentran en pase 0. Transcurridas 24 h, los cultivos se lavaron con PBS y se añadió medio de cultivo fresco. El medio se cambió cada dos días.

Una vez que la monocapa celular en pase 0 alcanzó un 80-90% de confluencia, se aspiró el medio, se lavó dos veces con PBS y se incubó con TryPLE (Thermo Fisher) hasta la

obtención de una suspensión celular. A continuación, se añadió medio RPMI completo y la suspensión se centrifugó para obtener un sedimento celular que fue resuspendido en medio fresco precalentado. Este cultivo fue utilizado para la realización de los distintos experimentos.

## **5. Cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)**

Los fibroblastos embrionarios se obtuvieron a partir de embriones de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> a 14.5 días *post-coitum*. Una vez sacrificadas las hembras, se diseccionaron para extraer el saco embrionario y la placenta. En condiciones de esterilidad, se desecharon la cabeza y los órganos internos mientras que el resto del tejido embrionario (carcasas) se utilizó para obtener el cultivo primario de MEFs. En el caso de los ratones conteniendo la mutación K-Ras G12D, cada embrión se procesó de manera independiente, utilizándose parte del tejido de descarte para analizar su genotipo en el locus K-Ras por PCR. Las carcasas de los embriones se seccionaron en pequeñas piezas con la ayuda de un bisturí y se digirieron en una solución de tripsina al 0,25% durante 90 min a 37°C con agitación. La tripsinización se inactivó por adición de 3 volúmenes de DMEM completo, se centrifugó 1 min a 700g para separar el tejido no digerido y el sobrenadante obtenido se sembró en placas de cultivo. Las células se crecieron hasta confluencia en medio completo a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. En este momento, se considera que los fibroblastos se encuentran en pase 0 (Santiago-Josefat et al., 2004a). Una vez que la monocapa celular en pase 0 alcanzó el 80-90% de confluencia, se aspiró el medio de cultivo, se lavó dos veces con PBS y se disoció el cultivo primario por incubación con tripsina al 0,05% (p/v)-EDTA 0,5 mM. Tras una nueva centrifugación y resuspensión en medio fresco conteniendo DMSO al 10%, las células se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

## **6. Activación de la expresión del oncogén K-RasG12D mediante administración de AdenoCre por infección intranasal**

Una vez genotipados, los animales K-Ras<sup>LSL-G12D/+</sup>/AhR<sup>+/+</sup> y K-ras<sup>LSL-G12D/+</sup>/AhR<sup>-/-</sup> de entre 8 y 12 semanas de edad se utilizaron para la inducción de tumores en pulmón empleando para ello la administración nasal del adenovirus Ad5CMVCre (*Iowa University*). Este vector adenoviral permite la expresión transiente de la recombinasa Cre la cual eliminará el casete LSL y permitirá la expresión de K-Ras G12D. La suspensión de Ad5CMVCre se preparó pipeteando directamente los adenovirus en medio MEM a una concentración de  $2.5 \times 10^7$  PFU (*Plaque-forming unit*) por cada 55  $\mu$ l de medio, siendo esta la cantidad utilizada por ratón. Los animales se anestesiaron por inyección i.p. de 100-120  $\mu$ l de una mezcla de Ketamina/Valium/Atropina (0,25 mg/ml, 2 mg/ml, 0,1 mg/ml) manteniendo siempre su temperatura corporal mediante el uso de manta térmica. Una vez anestesiados, se inmovilizaron ventralmente en una cabina de bioseguridad y se les administraron por vía nasal 50  $\mu$ l de la suspensión adenovírica gota a gota con una micropipeta sincronizando el pipeteo con la respiración del animal. Tras la inoculación, los animales se devolvieron a la sala libre de patógenos del Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura.

## **7. Cultivo y mantenimiento de la línea celular IMR-90**

En este trabajo hemos empleado la línea de fibroblastos humanos inmortalizados IMR-90 procedente de pulmón. Estas células se cultivaron en medio DMEM (Gibco) suplementado con FBS al 10% (v/v) de (ThermoFisher), L-glutamina 2 mM (Invitrogen) y antibiótico-antimicótico al 1% (v/v) (Invitrogen). El cultivo se mantuvo en un incubador a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar el 70-80% de confluencia, momento en el que se tripsinizó y se transfirió a placas conteniendo medio fresco completo a una

dilución 1:3. La suspensión celular se centrifugó 5 min a 200 x g, se retiró el sobrenadante y el precipitado de células fue resuspendido en medio fresco precalentado. Las células se sembraron en placas individuales de 35 ó 60 mm o en placas multipocillos de 6, 12, 24 ó 48 pocillos dependiendo de las necesidades experimentales.

## 8. Tratamientos

Los reactivos químicos empleados en los tratamientos se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante. En las condiciones control, los cultivos se incubaron con los mismos volúmenes de solvente.

- **CH223191 (antagonista de AHR) (*Sigma Aldrich*):** disuelto en DMSO y utilizado a una concentración 10  $\mu$ M durante los tiempos indicados.
- **FICZ (6-Formylindolo (3,2-b) carbazol) (*Enzo*):** disuelto en DMSO y conservado en oscuridad a -20°C. Las células IMR90 se trataron a una concentración 10 nM a los tiempos indicados. Los tratamientos de ratones *in vivo* se realizaron inyectando i.p. 60 ng por animal en aceite de girasol, utilizando el mismo volumen de DMSO disuelto en aceite para los tratamientos control.

## 9. Irradiación de las células

Se indujo senescencia en las células IMR90 por exposición a radiación ionizante. Las placas se colocaron en el irradiador y se aplicaron 10 Gy de radiación gamma. Los controles negativos se mantuvieron el mismo tiempo en el irradiador sin aplicar irradiación.



La irradiación de las células se llevó a cabo en el equipo existente en el *Buck institute* (California) siguiendo los mecanismos de seguridad establecidos en los protocolos del Centro.

## 10. Inmunocitoquímica

Para analizar la expresión y la localización de las diferentes proteínas estudiadas, las células se sembraron en *coverslips* circulares de 14 mm de diámetro. Tras un lavado con PBS, las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 3,5% en PBS durante 10-15 min a temperatura ambiente. Tras lavar el exceso de paraformaldehído, se procedió a la permeabilización de la membrana celular utilizando una solución de permeabilización con Tritón X-100 al 0,1% y BSA al 0,2% en PBS. Los cristales se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon con BSA al 2% en PBS durante 30 min. A continuación, se incubaron con anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante los tiempos indicados para cada anticuerpo, a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Los anticuerpos primarios y las condiciones empleadas se indican en la Tabla M.2. Tras tres lavados con PBS, se llevaron a cabo las incubaciones con los anticuerpos secundarios marcados con diferentes fluoróforos durante 90 min a una dilución 1:350 a temperatura ambiente. Células incubadas únicamente con anticuerpos secundarios se usaron como control de especificidad del anticuerpo primario. Tras varios lavados adicionales con PBS, los *coverslips* con las células se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente con Hoeschst 33342 1 µg/ml en PBS. Tras eliminar el exceso de Hoeschst, se realizó el montaje utilizando una solución de PBS: glicerol (1:1). Las preparaciones se analizaron por microscopía confocal de fluorescencia empleando un equipo Olympus FV1000. Las imágenes se analizaron empleando el software FV10 (*Olympus*).

Anticuerpo primario	Dilución	Casa comercial	Anticuerpo secundario	Condiciones incubación
P16	1:200	<i>Novus</i>	Rabbit	Toda la noche. 4°C
P21	1:100	<i>Santa Cruz</i>	Mouse	Toda la noche. 4°C
Ciclin	1:75	<i>Santa Cruz</i>	Mouse	Toda la noche. 4°C
H2AX- $\gamma$	1:200	<i>Bethyl</i>	Rabbit	Toda la noche. 4°C
AhR	1:100	<i>Invitrogen</i>	Mouse	Toda la noche. 4°C

**Tabla M.2.** Anticuerpos empleados para el análisis de proteínas por inmunofluorescencia.

## 11. Análisis de niveles proteicos mediante immunoblotting (Western-blotting)

### 24.6- Preparación de extractos proteicos de hígado de ratón

Se extrajo un fragmento de 50 mg de tejido del lóbulo izquierdo del hígado de ratón. Se realizó un primer lavado con PBS a 4°C para eliminar los eritrocitos y el tejido se resuspendió en tampón de extracción de proteínas TNE (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, Nonidet P-40 al 1% (v/v), EDTA 20 mM) suplementado con PMSF 1 mM y 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  del inhibidor de proteasas Complete (Roche). Posteriormente, se procedió a homogenizar el tejido con un homogeneizador *tissue master* (OMNI). El homogeneizado resultante se incubó durante 1-2 h a 4°C con agitación continua en un rotador para facilitar la lisis de la suspensión celular. A continuación, se centrifugó durante 15 min a 15000 x g recogiendo el sobrenadante y conservándose a -80°C hasta su uso.

#### **24.7- Medida de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas de los extractos celulares se determinó por el método colorimétrico de Bradford utilizando el reactivo *Coomassie plus protein assay reagent* (Pierce) y albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Para ello, se tomaron cantidades crecientes de BSA (entre 0,5 y 3,0 µg) que se diluyeron en agua hasta un volumen final de 200 µl. Las muestras se prepararon en una placa de 96 pocillos, añadiendo 1 µl de extracto proteico en 119 µl de agua. Tanto en las muestras como en la recta patrón, se añadieron 80 µl de reactivo de Coomassie, se homogenizó y se midió la absorbancia a 595 nm en el lector multiplaca *plate reader* AF2200. La concentración de proteína de cada uno de los extractos se determinó por regresión lineal a partir de la recta patrón construida con las cantidades conocidas de BSA.

#### **24.8- Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y transferencia a membranas de nitrocelulosa**

Para la realización de electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) se utilizó el sistema de tampón discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Alícuotas de 10 a 40 µg de extracto proteico se mezclaron con el volumen adecuado de tampón de carga para proteínas que contenía Tris-HCl 62,2 mM pH 6.8, SDS al 10% (p/v), glicerol al 50% (v/v), azul de bromofenol al 0,025% (p/v) y β-mercaptoetanol al 20% (v/v). Las proteínas se desnaturalizaron por incubación a 95°C durante 5 min y se separaron en función de su peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida (*Bio-Rad*) en condiciones desnaturalizantes empleando un tampón que contenía Tris 25 mM, glicina 190 mM y SDS al 0,1% (p/v). Las concentraciones de poliacrilamida empleadas oscilaron entre el 7% y 12 %, en función del peso molecular de las proteínas en estudio.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Bio-Rad*) por aplicación de un campo eléctrico en una cubeta con tampón de transferencia que contenía Tris 25 mM, glicina 190 mM y metanol al 20% (v/v). La transferencia se realizó a 4°C aplicando una intensidad de campo eléctrico entre 1000 y 1400 mA, dependiendo de la proteína en estudio. Las membranas se tiñieron con el colorante reversible Ponceau S (*Sigma-Aldrich*) con el fin de comprobar la eficacia de la transferencia y la homogeneidad de carga para las diferentes muestras. Posteriormente, las membranas se bloquearon durante 2 h a temperatura ambiente en tampón TBS-T que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 75 mM y Tween-20 al 0,2% (v/v) y al que se añadió leche desnatada al 5% (p/v). Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente empleando la dilución y las condiciones indicadas en la Tabla M.3.

Anticuerpo primario	Dilución	Peso molecular	Casa comercial	Anticuerpo secundario	Condiciones incubación
AhR	1:1000	95 kDa	<i>Biomol</i>	Rabbit	Toda la noche 4° C
P53	1:1000	44KDa	<i>Cell Signaling</i>	Mouse	Toda la noche 4° C
Actin	1:1000	42KDa	<i>Thermo Fisher</i>	Rabbit	Toda la noche 4° C

**Tabla M.3.** Anticuerpos empleados para el análisis de proteínas por *Western blot*.

Tras 5 lavados de 10 min cada uno en TBS-T, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP). A continuación, las membranas se sometieron a 5 lavados de 10 min cada uno en TBS-T y a un lavado final de 5 min en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 75 mM). Finalmente, se añadió el sustrato quimioluminiscente *SuperSignal Chemiluminescent Substrate* (*Pierce*) durante 5 min a temperatura ambiente. Las

membranas se revelaron utilizando un equipo *Molecular Imager ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad). Como control interno para normalizar los niveles de proteína, se utilizó la inmunodetección de  $\beta$ -Actina y la tinción de la membrana con el colorante Ponceau S. La cuantificación de los niveles de expresión por densitometría se realizó con el programa de análisis y procesamiento de imágenes *ImageJ*.

## **12. Análisis de la expresión génica mediante transcripción reversa (RT) y PCR cuantitativa (qPCR)**

### **24.9- Extracción del RNA total.**

#### **12.1.1- A partir de cultivos celulares**

La obtención de RNA total a partir de cultivos celulares se realizó empleando el kit *High Pure RNA isolation (Roche)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado, se determinó su concentración midiendo su absorción espectrofotométrica a 260 nm y la presencia de proteínas contaminantes estableciendo la relación  $A_{260nm}/A_{280nm}$ .

#### **12.1.2- A partir de tejidos**

El tejido, previamente extraído y congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  se colocó en hielo seco y se añadió 1 ml de Trizol (*Invitrogen*) por cada 100 mg de tejido. A continuación, se homogenizó utilizando el homogeneizador *tissue master* (OMNI). El homogeneizado resultante se dejó reposar en Trizol durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1 ml de cloroformo por cada ml de Trizol y se agitó empleando un vórtex durante 15 s. Tras 2-3 min a temperatura ambiente se centrifugó a  $12.000 \times g$  durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Tras la centrifugación, se pudieron observar dos fases en el tubo, transfiriéndose la fase acuosa superior a un tubo limpio evitando arrastrar contaminantes de la fase

orgánica inferior. Seguidamente se añadieron a la solución acuosa 500 µl de isopropanol por cada ml de Trizol usado y se agitó en un vórtex. A continuación, se centrifugó a 12.000 x *g* durante 10 min a 4°C. Tras la centrifugación, el sobrenadante se eliminó y el RNA precipitado se lavó con etanol al 80%, y se centrifugó a 7.500 x *g* durante 5 min a 4°C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el RNA se dejó secar a temperatura ambiente durante 2-3 min en un termobloque a 70°C con el fin de conseguir la total evaporación del alcohol. El precipitado obtenido se resuspendió en 100 µl de agua DEPC (*diethyl pyrocarbonate*) y se hidrató en un termobloque a 50°C durante 5-10 min.

Para eliminar la contaminación de DNA genómico de la muestra y limpiar posibles restos salinos, se utilizó el kit comercial *High Pure RNA isolation (Roche)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado, se determinó la concentración del RNA de la muestra midiendo la absorción espectrofotométrica a 260 nm y la presencia de proteínas contaminantes estableciendo la relación  $A_{260nm}/A_{280nm}$ .

#### 12.1.3- A partir de embriones preimplantacionales

La obtención de RNA total a partir de embriones preimplantacionales de ratón se realizó empleando el kit comercial *PicoPure RNA Isolation Kit (Thermo Fisher)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron pools de embriones obtenidos a tiempos de desarrollo entre 1,5 y 3,5 dpc. Una vez purificado el RNA, se determinó su concentración utilizando un bioanalizador.

### 13. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR.

Para los ensayos de qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*), previamente se transcribieron de forma reversa (*Reverse Transcription, RT*) entre 200 ng y 1 µg de RNA total empleando el kit *iScript Reverse Transcription (Bio-Rad)*. Este kit contiene *random primers* que hibridan con cualquier secuencia aleatoria de 6 nucleótidos presentes en el

RNA celular. La reacción de qPCR se llevó a cabo utilizando el kit *SYBR Select Master MIX* (Life Technologies). Para ello, se realizó una primera etapa de desnaturalización a 95°C durante 10 min seguida de una repetición de un máximo de 50 ciclos en cada uno de los cuales se realizaron los tres pasos siguientes: desnaturalización del DNA a 95°C durante 30 s, hibridación de los cebadores al DNA molde durante 30 s a una temperatura específica para cada producto de PCR y extensión de la cadena naciente a 72°C durante 30 s. Se realizaron curvas de fusión al final de cada reacción para confirmar la amplificación de un único producto de PCR. Para ello, se midió la emisión de fluorescencia de *SYBR Green* durante el cambio paulatino de temperatura de 60°C a 95°C a razón de 0,5°C/ciclo. La secuencia de los cebadores que se utilizaron para qPCR y sus temperaturas de hibridación se detallan en la Tabla M.4. La amplificación del gen *Gapdh* se usó como control interno para normalizar la expresión de los genes objeto de estudio ( $\Delta C_t$ ). Como control negativo se realizaron reacciones de PCR en las que no se añadió cDNA molde. La expresión de cada gen o de cada transcrito se calculó refiriendo los valores obtenidos en presencia de tratamiento a los correspondientes a la situación basal o de no tratamiento ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ).

Genes	Secuencia <i>primers</i> (5'--3')		T <sup>a</sup>
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
<b><i>gapdh</i></b>	5' TGAAGCAGGCATCTCAGGG 3'	5' CGAAGGTGCAAGAGTGGGAG 3'	59 °C
<b><i>ahr</i></b>	5' AGCCGGTGCAGAAAACAGT 3'	5' AGGCGGTCTAACTCTGTGT 3'	59 °C
<b><i>cyp1a1</i></b>	5' ACAGACAGCCTCATTGAGCA 3'	5' GGCTCCACGAGATAGCAGTT 3'	59 °C
<b><i>cyp1a1</i></b>	5' CTCTCCCTGGATGCCTTCAA 3'	5' GGATGTGGCCCTTCTCAAATG 3'	59 °C
<b><i>actina</i></b>	5' TGTTACCAACTGGGACGACA 3'	5' GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA 3'	59 °C
<b><i>ahr</i></b>	5' ACATCACCTACGCCAGTCGC 3'	5' TCTATGCCGCTTGAAGGAT 3'	59 °C
<b><i>nanog</i></b>	5' CAAGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG	5' TTTTGTGTTGGGACTGGTAGAAGAATCAG	59 °C
<b><i>oct4</i></b>	5' AGAGGGAACCTCCTCTGAGC 3'	5' CCAAGGTGATCCTCTTCTGC 3'	59 °C
<b><i>sox2</i></b>	5' CGTAAGATGGCCCAGGAGAA 3'	5' GCTTCTCGGTCTCGGACAAA 3'	59 °C

<b><i>βcatenin</i></b>	5' GTGCAATTCCTGAGCTGACA 3'	5' CTAAAGATGGCCAGCAAGC 3'	59 °C
<b><i>lats1</i></b>	5' GACCCAGCTAATGGACAAA 3'	5' GTTTCAGTCCAGGGACATT 3'	59 °C
<b><i>lats2</i></b>	5' GTGTCCACAAGATGGGCTTT 3'	5' CTCCATGCTGTCCTGTCTCA 3'	59 °C
<b><i>cdx2</i></b>	5' TCTCCGAGAGGCAGGTAAA 3'	5' GCAAGGAGGTCACAGGACTC 3'	59 °C
<b><i>gata3</i></b>	5' CCGAAACCGGAAGATGTC 3'	5' TCAGCATGTGGGTGGAGT 3'	59 °C
<b><i>mtch1</i></b>	5' CAGAATCCAGGTTCCAGTT 3'	5' TCAGGTAATCCAGCAGTGG 3'	59 °C
<b><i>scl2a1</i></b>	5' CCCCAGAAGGTTATTGAGGA 3'	5' GGTTCATCATCAGCATGGAG 3'	59 °C
<b><i>scl2a3</i></b>	5' CTTATGGGATTCGCCAAGAT 3'	5' TACCAGAATCCCAACAACGA 3'	59 °C
<b><i>tdh</i></b>	5' AAGCTTGTCTTGCCCTTGAA 3'	5' CTTCCAAATCGTTTCCTCA 3'	59 °C
<b><i>pdh</i></b>	5' GCCAGCACGGACTACTACAA 3'	5' TTCTCGAGTGCGGTAGCTTA	59 °C
<b><i>sox17</i></b>	5' CTGTACTACGGCGCGATG 3'	5' GAGCTCAGTGGGCTGGTT	59 °C
<b><i>hk</i></b>	5' TGTTGAGAAGATGGTGAGC 3'	5' CATACTGCTGGACCGATAC	59 °C
<b><i>nanog</i></b>	5' AAGTACCTCAGCCTCCAGCA 3'	5' GTGCTGAGCCCTTCTGAATC 3'	59 °C
<b><i>oct-04</i></b>	5' CACGAGTGGAAGCAACTCA 3'	5' TTCATGTCCTGGGACTCCTC 3'	59 °C
<b><i>p16</i></b>	5' TACCCGATTCAAGGTGAT 3'	5' TTGAGCAGAAGAGCTGCTACGT 3'	59 °C
<b><i>p21</i></b>	5' GCCTTAGCCCTCACTCTGTG 3'	5'AGCTGGCCTTAGAGGTGACA 3'	59 °C
<b><i>p53</i></b>	5'TGGAAGACTCCAGTGGGAA 3'	5' TCTTCTGTACGGCGGTCTCT 3'	59 °C
<b><i>ucp2</i></b>	5' CTCTCCTGAAAGCCAACCTC 3'	5' AAGGCATGAACCCCTTGTA 3'	59 °C
<b><i>sox2</i></b>	5' TGCGAGCGCTGCACAT 3'	5' TCATGAGCGTCTTGTTTTCC 3'	59 °C
<b><i>gata4</i></b>	5' GCCTCTCCTGTGCCAACT 3'	5' AGGGAGGGAGGGTCTCAC3'	59 °C
<b><i>gata6</i></b>	5' TGCCTCGACCACTTGCTA 3'	5' CTGAGGTGGTCGCTTGTA 3'	59 °C
<b><i>fgf4</i></b>	5' CGGCTCTACTGCAACGTG 3'	5' AAAGGCACACCGAAGAGC 3'	59 °C
<b><i>tnf</i></b>	5'CCACCACGCTCTTGTCTA 3'	5'CTCCACTTGGTGGTTTGCTA 3'	59°C
<b><i>il1</i></b>	5'CGGGTGACAGTATCAGCAAC 3'	5'GACAACTTCTGCCTGACGA 3'	59°C
<b><i>glut4</i></b>	5'ATGACCAAGCCCTGAATCTG 3'	5'CGTAGGATGTGGTGATGACG 3'	59°C
<b><i>mmp3</i></b>	5'AGTCAGGGTCACCCACAAAG 3'	5'GCATTGGGTATCCATCCATC 3'	59°C
<b><i>gapdh</i></b>	5' CCACCCAGAAGACTGTGGAT 3'	5' TTCTAGACGGCAGGTCAGGT 3'	59 °C
<b><i>tdh</i></b>	5' AAGCTTGTCTTGCCCTTGAA 3'	5' CTTCCAAATCGTTTCCTCA 3'	59 °C



<b>p53</b>	5' GACAAGCGGCAGATTGTAGA 3'	5' TCCGCAGCCTTCTATTTTC 3'	59 °C
<b>hk</b>	5' TGTTTCGAGAAGATGGTGAGC 3'	5' CATACGTGCTGGACCGATAC 3'	59 °C
<b>sox17</b>	5' CTGTACTACGGCGCGATG 3'	5' GAGCTCAGTGGGCTGGTT 3'	59 °C

**Tabla M.4.** Secuencias de oligonucleótidos para qPCR y condiciones de hibridación.

#### 14. Análisis del ciclo celular

Las fases del ciclo celular se analizaron en los cultivos de fibroblastos primarios de la cola (TTFs) y embrionarios (MEFs) mediante tinción con ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo. Las células se sembraron en placas de 12 pocillos en medio completo. A los tiempos indicados se tripsinizaron las células y tras un lavado en PBS, el precipitado celular se resuspendió en etanol al 70% (almacenado a -20°C) con agitación suave durante 2 min. A continuación, se centrifugó a 5.000 x g durante 5 min, el precipitado se resuspendió en 1 ml de PBS y se centrifugó nuevamente otros 5 min a 5.000 x g. El precipitado obtenido se resuspendió en 900 µl de PBS al que se añadieron 1 µg de RNAasa (Sigma-Aldrich) y 50 µg de ioduro de propidio (Molecular Probes), se agitó suavemente y se incubó 30 min a 37°C. Finalmente, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Cytomics FC-500 (Beckman-Coulter) en la unidad de citometría del Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura.

#### 15. Medida de la proliferación celular.

Para analizar la proliferación celular, se sembraron  $10^4$  células por pocillo en una placa de 24 pocillos. A intervalos de 12 h, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se contaron mediante un *cell counter* (Invitrogen). Cada tiempo de duplicación se calculó como la media  $\pm$  desviación estándar de cada pocillo.

## **16. Tinción con hematoxilina y eosina**

Una vez desparafinadas e hidratadas, las secciones de 3-5  $\mu\text{m}$  de los diferentes tejidos, se incubaron en una solución de hematoxilina de Harris durante 10 min, tras lo cual se lavaron con agua hasta conseguir que el color de la hematoxilina virara hasta azul violáceo (al menos 20 min en agua templada). Después, se incubaron con una solución de eosina durante 30 s y se lavaron para eliminar el exceso de este reactivo. Tras un paso de deshidratación, las secciones se montaron empleando el medio DPX (*Sigma-Aldrich*) y se observaron y fotografiaron en un microscopio *Olympus BX51*.

## **17. Inmunofluorescencia de tejidos**

Las secciones de tejidos, previamente fijadas e incluidas en parafina, se desparafinaron en xilol, deshidrataron en etanol y rehidrataron gradualmente con PBS. Una vez hidratadas, se realizó un desenmascaramiento con un tampón citrato pH 6,0. Tras lavar con PBS-Tritón (0,05% v/v), se llevó a cabo el bloqueo de los epítomos inespecíficos con la solución de bloqueo PBS-Tritón (0,05% v/v), gelatina 0,2 % (p/v) y BSA (2% p/v). A continuación, las secciones se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo en las condiciones indicadas en la Tabla M.5. Concluida la incubación, las secciones se lavaron tres veces con PBS-T-G durante 10 min y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con los fluorocromos Alexa-633, Alexa-488 ó Alexa-550. Tras lavar nuevamente con PBS-T-G, las secciones se incubaron con Hoestch 33342 diluido 1:1000 en PBS durante 5 min, se lavaron con PBS para eliminar el exceso de sonda y se montaron con cubreobjetos utilizando una solución de PBS:glicerol. La visualización de las secciones se realizó en un microscopio confocal Olympus FV1000 en la unidad de microscopía del Servicio de

Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura. Las imágenes fueron analizadas empleando el software FV10 (*Olympus*).

Anticuerpo primario	Dilución	Casa comercial	Anticuerpo secundario	Condiciones incubación
<b>Sox2</b>	1:150	<i>Novus</i>	Rabbit	Toda la noche 4°C
<b>SPTC</b>	1:200	<i>Millipore</i>	Rabbit	Toda la noche 4°C
<b>EpCAM</b>	1:200	<i>Santa Cruz</i>	Rat	Toda la noche 4°C
<b>Aldh1a1</b>	1:200	<i>Abcam</i>	Rabbit	Toda la noche 4°C
<b>Scgb1a1</b>	1:100	<i>Novus</i>	Rabbit	Toda la noche 4°C
<b>SFPTC</b>	1:200	<i>Millipore</i>	Rabbit	Toda la noche 4°C
<b>PORCN</b>	1:150	<i>Millipore</i>	Mouse	Toda la noche 4°C
<b>Lgr5</b>	1:200	<i>Origene</i>	Mouse	Toda la noche 4°C

**Tabla M.5.** Anticuerpos empleados para el análisis de proteínas por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

## 18. Inmunofluorescencia por Whole Mount de embriones de ratón

Con el fin de poder estudiar la expresión y la localización de las proteínas de interés en los embriones preimplantacionales de ratón, se llevaron a cabo tinciones en *whole mount* en los distintos estadios. Una vez aislados los embriones, para su tinción, se manipularon utilizando un *striper* bajo una lupa de disección. En primer lugar, se lavaron en PBS y se pasaron a paraformaldehído al 3,5% para su fijación durante 15 min a temperatura ambiente. Tras ser lavados nuevamente para retirar el exceso de formaldehído, la zona pelúcida se eliminó por incubación en solución ácida de Tyrode durante 15-20 s a 37°C. Tras varios lavados, los embriones se colocaron en solución de

bloqueo (PBS -BSA al 1% y glicina 0,1 M) durante 2,5 h. A continuación, se procedió a la incubación con anticuerpos primarios en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Después de varios lavados, se realizó una incubación con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa-633, Alexa-488 ó Alexa-550 a una dilución 1:350 durante 2 h 4°C. Seguidamente, los embriones se lavaron e incubaron con Hoeschst 33342 durante 5 min para teñir los núcleos celulares. Durante todo el proceso, los embriones se dispusieron en gotas con las diferentes soluciones o en placas Ibidi para incubaciones de larga duración. Una vez teñidos, se transfirieron a cámaras Ibidi con PBS estéril y se analizaron usando un microscopio confocal Olympus FV1000.

Los anticuerpos utilizados, así como sus condiciones de incubación se encuentran detallados en la Tabla M.6.

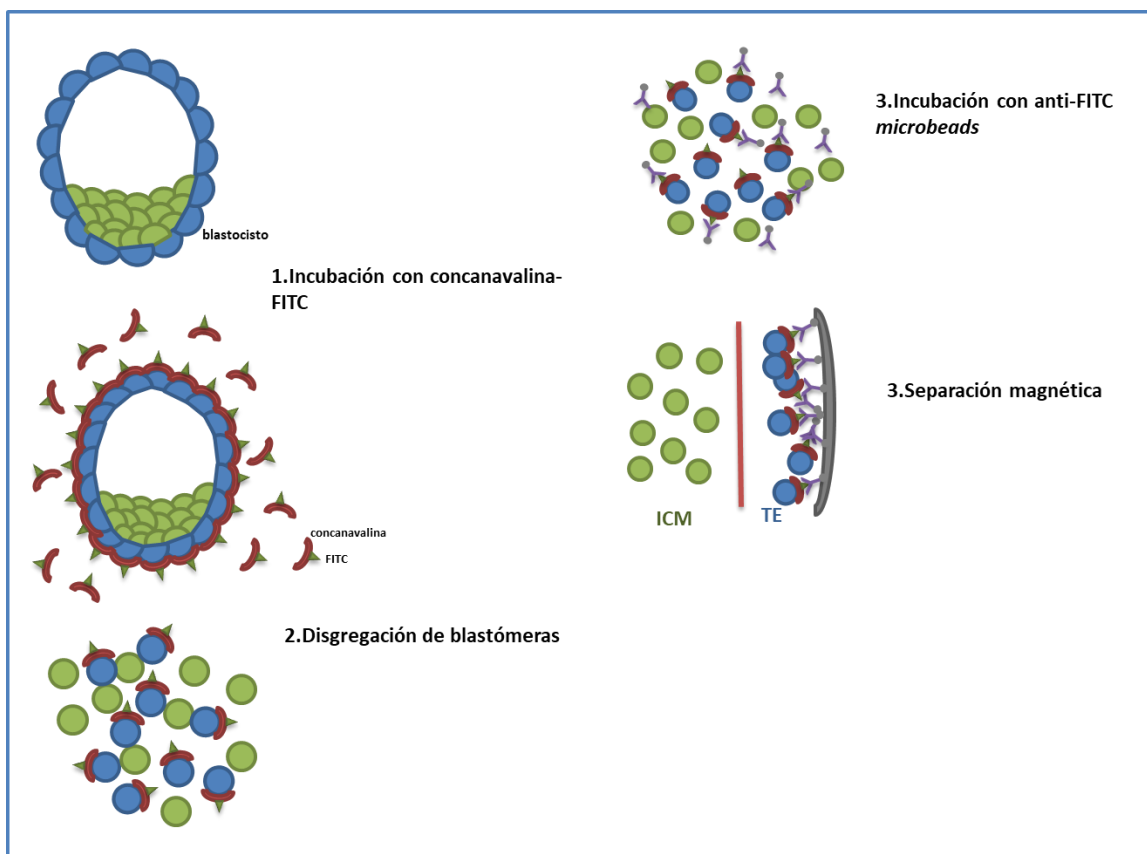
<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Condiciones incubación</b>
<b>Nanog</b>	1:150	<i>Novus</i>	Rabbit	Toda la noche 4°C
<b>Oct4</b>	1:75	<i>Santa Cruz</i>	Mouse	Toda la noche 4°C
<b>YAP</b>	1:150	<i>Novus</i>	Rabbit	Toda la noche 4°C
<b>AhR</b>	1:50	<i>Biomol</i>	Rabbit	Toda la noche 4°C
<b>pYAP</b>	1:75	<i>Thermo Fisher</i>	Rabbit	Toda la noche 4°C

**Tabla M.6.** Anticuerpos empleados para el análisis de proteínas por inmunofluorescencia en montaje completo (*Whole Mount*).

## 19. Separación magnética de blastómeros de trofotodermo y masa celular interna (Inner Cell Mass, ICM)

Los dos tipos celulares que constituyen el blastocito (células indiferenciadas de la masa celular interna y células del trofotodermo) se separaron utilizando concanavalina y *microbeads* MACS empleando protocolos descritos previamente (Ozawa y Hansen 2011). Los blastocistos se aislaron a 3,5 d.p.c y se utilizaron en grupos de 15-20 por genotipo en cada experimento. Una vez aislados y lavados en PBS, se incubaron en solución ácida Tyrode's durante unos 30 s para eliminar la zona pelúcida con observación continua bajo la lupa, transfiriéndose inmediatamente a PBS para su neutralización. A continuación, se lavaron tres veces en tampón MACS [DPBS con BSA al 0,5% (p/v) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM, pH 7,2] y se incubaron durante 10 min en concanavalina A conjugada con FITC (ConA-FITC, *Sigma-Aldrich*) a una concentración de 1 mg/ml en tampón MACS (Figura M.3). La concanavalina A tiene la capacidad de unirse a la superficie celular, de modo que todos los blastómeros externos del embrión quedarán marcados. Tras tres lavados en tampón MACS, los blastocistos se incubaron en PBS conteniendo 1 mM EDTA durante 5 min seguido de una incubación en tripsina-EDTA al 0,05% (p/v) (*Invitrogen*) durante 10 min a 37°C para la disgregación de los blastómeros, pipeteando con un *striper* (*Origio*) bajo la lupa. Los blastómeros aislados se transfirieron a PBS conteniendo EDTA 1 mM y FBS al 10% (v/v) para detener la reacción de tripsinización; a continuación, se lavaron en tampón MACS por centrifugación a 500 x g durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y los blastómeros se resuspendieron en 110 µl de tampón MACS. Posteriormente se incubaron con 10 µl de *microbeads* magnéticas conjugadas con anti-FITC (*Miltenyi Biotec*) durante 15 min en hielo. Después de dos lavados por centrifugación a 500 x g durante 5 min, se añadieron 500 µl de tampón MACS y se pasaron a través de columnas de separación MACS (*Miltenyi Biotec*) empleando un soporte magnético (*Spherotech*). La fracción FITC negativa (ICM) se eluyó con tres lavados de

tampón MACS. La elución de la fracción FITC positiva (TE) se realizó retirando la columna de separación del soporte magnético y lavando tres veces con 500 µl de tampón MACS.



**Figura M.3.** Esquema del protocolo seguido para la separación magnética de la masa celular interna y el trofotodermo.

## 20. Análisis del volumen mitocondrial mediante tinción con Mitotracker Green

Para estudiar el volumen mitocondrial de los embriones utilizamos el reactivo Mitotracker Green, que tiñe específicamente mitocondrias independientemente de su potencial de membrana, pudiendo ser detectado por su emisión de fluorescencia a 516 nm cuando es excitado a 490 nm.

Los embriones, una vez aislados del útero o del oviducto, se lavaron con PBS y se colocaron en una solución de tinción conteniendo 100 nM de Mitotracker green (*Cell Signaling*) diluido en medio KSOM (*EmbryoMax, Millipore*) en placas IBIDI con ayuda de un *striper (Origio)* bajo la lupa. Los embriones se incubaron a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 20 min. A continuación, se lavaron dos veces en PBS, se tiñeron los núcleos con Hoeschst 33352 (1:1000 en PBS), se lavaron nuevamente y se analizaron por microscopía confocal usando un microscopio confocal Olympus FV1000.

## **21. Medida la actividad mitocondrial mediante tetrametilrodamina (TMRM)**

El éster metílico tetrametilrodamina (TMRM) es una sonda catiónica fluorescente que penetra en la célula quedando secuestrada por las mitocondrias metabólicamente activas. Una vez captada por las mitocondrias, emite fluorescencia a 570 nm cuando es excitada a 540 nm.

### **24.1- Medida del potencial de membrana de células (TTFs)**

Para el análisis de fluorescencia por microscopía confocal, se retiró el medio de cultivo a las células y se añadió medio RPMI completo sin rojo fenol conteniendo 4 nM de tetrametilrodamina. Las células se incubaron en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 30 min, tras lo cual se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS. Para la tinción de los núcleos, se procedió a una incubación con Hoeschst 33352 diluido 1:1000 en RPMI durante 5 min, tras lo cual, se retiró la solución de tinción, las muestras se cubrieron con medio completo sin rojo fenol y se analizaron en un microscopio confocal Olympus FV1000.

Para la cuantificación por citometría de flujo, se procedió a la tinción de las células como se ha indicado anteriormente analizándose en un equipo Cytoflex S (*Beckman-Coulter*).

#### **24.2- Medida del potencial de membrana de embriones preimplantacionales**

Los embriones fueron extraídos del útero u oviducto, lavados en PBS y transferidos inmediatamente a una placa IBIDI conteniendo una solución de tinción de tetrametilrodamina (*Invitrogen*) 100  $\mu$ M en KSOM (*EmbryoMax, Millipore*) en la que fueron incubados durante 30 min a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, las muestras se lavaron dos veces en PBS bajo la lupa y se incubaron durante 5 min con Hoeschst 33352 diluido 1:1000 en PBS para la tinción de los núcleos. Una vez lavados, se analizaron por microscopía confocal usando un microscopio confocal Olympus FV1000.

#### **22. Medida de la actividad mitocondrial mediante JC10**

JC-10 es un colorante catiónico y lipofílico que se concentra y forma agregados de forma reversible los cuales emiten fluorescencia roja a una longitud de onda de 590 nm cuando son excitados a 540 nm, pero sólo en aquellas mitocondrias que presentan una membrana polarizada. Cuando el potencial de membrana colapsa, JC-10 no puede ser retenido en las mitocondrias y la molécula adquiere una estructura monomérica, emitiendo entonces fluorescencia verde a una longitud de onda de 525 nm cuando es excitada a 490 nm.

Para analizar el potencial de membrana mitocondrial de los fibroblastos de ratón, se sembraron  $1 \times 10^4$  células en placas de 96 pocillos con medio RPMI completo durante 14-24 h. Durante este tiempo, se comprobó el estado de las células al microscopio y cuando la confluencia fue aproximadamente del 60%, se retiró el medio, se lavó con PBS y



los fibroblastos se procesaron empleando el *mitochondrial membrane potential kit (Sigma)*, siguiendo las indicaciones del fabricante para células adherentes. Para el estudio de la actividad mitocondrial de los embriones, se colocaron grupos de 25 embriones en pequeñas gotas de medio KSOM completo en placas de 96 pocillos. Se añadieron 50 µl de solución de tinción JC-10 a cada pocillo y la placa se incubó en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C durante 30 min. A continuación, se añadieron 50 µl de tampón de ensayo y se monitorizó la intensidad de fluorescencia en un lector de fluorescencia multiplaca *plate reader AF2200 (Eppendorf)* recogiendo la emisión de fluorescencia a 590 nm o 525 nm para la forma agregada (rojo) o monomérica (verde), respectivamente. Se emplearon las longitudes de onda de excitación indicadas anteriormente. El potencial de membrana mitocondrial se calculó utilizando la relación de fluorescencias roja / verde.

### **23. Medida de la actividad Hexoquinasa**

Para estudiar el metabolismo de la glucosa, se utilizó el *Picoprobe Hexokinase activity assay kit (Biovision)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el análisis de consumo de glucosa en hígado, se homogenizaron 30 mg de tejido en 300 µl de buffer *HK* frío utilizando un homogeneizador manual. Tras centrifugar a 10.000 x g y 4°C durante 5 min, se recogió el sobrenadante que fue utilizado para llevar a cabo el protocolo establecido por el fabricante.

Para determinar la actividad hexoquinasa en embriones preimplantacionales, se utilizaron grupos de 20 blastocistos que fueron disgregados durante 10 min a 37°C por incubación en una solución de EDTA conteniendo tripsina al 0,05% (p/v) (*Invitrogen*), tras lo cual, las muestras fueron agitadas y centrifugadas. Tras realizar dos lavados en PBS suplementado con EDTA 1 mM y FBS al 10% (v/v) y un lavado adicional en PBS, los blastómeros individuales se resuspendieron en *HK buffer assay* y se homogenizaron por

pases sucesivos a través de una jeringa de 30 G. El homogeneizado resultante se utilizó en el kit indicado anteriormente siguiendo las indicaciones del fabricante.

## **24. Análisis de senescencia celular en hígado**

### **24.3- Tinción de las criosecciones**

El hígado extraído del animal se fijó durante toda la noche (14-18 h) en paraformaldehído al 4%, se lavó en PBS y se pasó a una solución de PBS-sacarosa al 15% durante 24 h. A continuación, se prepararon criomoldes con una base de gelatina al 10% en PBS y los lóbulos hepáticos se colocaron en gelatina líquida en el interior de los moldes. Se mantuvieron a 4°C hasta su solidificación y se congelaron usando un baño de enfriamiento controlado (*cooling bath*), tras lo cual se almacenaron a -80°C. Utilizando un criotomo, se cortaron secciones de 20 µm que se tiñeron empleando el siguiente protocolo. Las secciones se colocaron en una solución de MgCl<sub>2</sub> 2 mM en PBS a pH 6,0 durante 10 min, repitiéndose este paso tras renovar la solución. A continuación, las secciones fueron fijadas a temperatura ambiente durante 5 min en una solución de PBS conteniendo formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,2%. Posteriormente, se lavaron en PBS y se incubaron durante 48 h a 37°C en una solución conteniendo 1 mg/ml de X-Gal, ferrocianuro de potasio 5 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM y ácido cítrico 40 mM en PBS a pH 6,0. Pasado dicho periodo de incubación, los porta-objetos se lavaron y se montaron empleando una solución PBS-glicerol 1:1. Las secciones se observaron y fotografiaron en un microscopio *Olympus BX51*.

#### **24.4- Análisis por citometría de flujo**

Se utilizó el sustrato fluorescente de la  $\beta$ -galactosidasa C12FDG para cuantificar la senescencia celular en hígado mediante citometría de flujo. Los ratones fueron sacrificados y los hígados extraídos y transferidos a tubos conteniendo medio completo alpha-MEM suplementado con FBS al 10% y penicilina/estreptomicina 1%; estos tejidos fueron entonces disgregados mecánicamente en un equipo gentleMACS™ Octo Dissociator (*Miltenyi*). La suspensión resultante se filtró a través de filtros de 30  $\mu$ m y se centrifugó durante 5 min a 500 g. Una vez retirado el sobrenadante, el precipitado obtenido se resuspendió en PBS conteniendo BSA al 0,1%, Hoechst 33258 a una concentración de 10  $\mu$ g/ $\mu$ l y C12FDG 60  $\mu$ M. En cada condición experimental se incluyó un control negativo sin el sustrato C12FDG. El homogeneizado celular hepático se incubó durante 20 min a 37°C con agitación y se analizó utilizando un citómetro Cytoflex S (*Beckman-Coulter*).

#### **25. Cuantificación de células progenitoras hepáticas**

El hígado se extrajo del animal y se procesó hasta obtener una suspensión celular empleando el mismo procedimiento indicado en el apartado anterior. Los precipitados celulares se resuspendieron en PBS suplementado con BSA al 0,1% y se incubaron en presencia de anticuerpos específicos frente a los marcadores de células hepáticas indiferenciadas CD133 (0,01  $\mu$ g/ $\mu$ l, PE-Anti-*mouse*) y CD326 (0,3  $\mu$ g/muestra, EpCAM-APC) (Y. Chen et al., 2012). En cada condición se utilizó un control negativo en ausencia de anticuerpos. Las suspensiones celulares se incubaron durante 20 min a 37°C con agitación y se analizaron utilizando un citómetro Cytoflex S (*Beckman-Coulter*).

## **26. Cuantificación de células progenitoras en médula ósea**

La médula ósea se extrajo del fémur de ratón como se ha descrito previamente (Lwin, Edwards, & Silbermann, 2016). Una vez aislado el fémur del animal, se cortó la epífisis superior y el hueso se dispuso hacia abajo en un tubo eppendorf realizando una perforación en su epífisis inferior. Utilizando un tubo colector, se aisló la médula ósea centrifugando durante 2 min a 8000 x g. Las células de médula ósea se resuspendieron en PBS y la suspensión se pasó por un filtro de 30  $\mu$ m. A continuación, se centrifugó durante 5 min a 500 g, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en PBS conteniendo BSA al 0,1% y los anticuerpos anti-Sca-1-APC a 0,3  $\mu$ g/muestra y CD44-VioBright™ FITC a 0,3  $\mu$ g/muestra (Miltenyi Biotec). Adicionalmente, a cada muestra se añadieron 10  $\mu$ g/ $\mu$ l de Hoechst 33342 e ioduro de propidio al 0,0005%. Las muestras se incubaron durante 15 min a 4°C en oscuridad con agitación. Tras la incubación, se lavaron con PBS mediante centrifugación y se resuspendieron en PBS conteniendo BSA al 0,1%, 10  $\mu$ g/ $\mu$ l de Hoechst 33342 e ioduro de propidio al 0,0005%. El análisis se realizó por citometría de flujo en un equipo Cytoflex S (*Beckman-Coulter*). En cada experimento se analizaron simultáneamente controles en ausencia de anticuerpos.

## **27. Obtención de plasma sanguíneo**

Una vez sacrificados los animales, las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca ventricular empleando una aguja de 18G. Volúmenes de 400-500  $\mu$ l de sangre fueron aspirados en una jeringa conteniendo anticoagulante e inmediatamente fueron depositados en tubos colectores conteniendo EDTA. Las células se separaron del plasma mediante centrifugación a 1500 x g durante 15 min. El plasma se llevó a un tubo fresco y se almacenó a -80°C.

## 28. Análisis de senescencia en cultivos celulares

### 28.1- Por citometría de flujo

Se sembraron  $6 \times 10^4$  células en placas de 24 pocillos y cuando alcanzaron el 70% de confluencia se procedió a su tinción con el sustrato fluorescente de la  $\beta$ -galactosidasa C12FDG a una concentración 60  $\mu$ M durante 30 min a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Durante los últimos 5 min de la tinción se añadió sonda Hoeschst 33352 para marcar los núcleos celulares.

### 28.2- Por tinción en placa de cultivo

Se sembraron  $3 \times 10^5$  células en placas de 6 pocillos en medio completo y cuando alcanzaron el 70% de confluencia se procedió a la tinción de la  $\beta$ -galactosidasa mediante la utilización del *senescence  $\beta$ -galactosidase staining Kit (Cell Signaling)*. Las células fueron fijadas en una solución compuesta por formaldehído y glutaraldehído e incubadas durante 24 h con el sustrato X-gal, el cual, una vez hidrolizado por la enzima  $\beta$ -galactosidasa genera un precipitado azul insoluble que permite cuantificar la actividad de esta enzima asociada a senescencia celular.

## 29. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Con el fin de determinar la unión de una proteína a una región de DNA *in vivo*, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (***Chromatin Immunoprecipitation***, ChIP). Para cada experimento se utilizaron 60 mg de tejido hepático seccionado en pequeñas piezas con ayuda de un bisturí. En primer lugar, con el fin de estabilizar las uniones de las proteínas al DNA, se añadió formaldehído al 1% durante 15 min a temperatura ambiente con agitación suave. La reacción de entrecruzamiento proteína-DNA se detuvo añadiendo glicina 0.125 M durante 5 min. A continuación, el

tejido se lavó dos veces con PBS frío, se homogeneizó y las suspensiones celulares se resuspendieron e incubaron durante 10 min a 4°C en tampón de lisis-SDS conteniendo inhibidores de proteasas (*Complete, Roche*). Los lisados celulares fueron sonicados durante 20-30 min en un equipo Bioruptor (*Diagenode*) a máxima potencia con ciclos de 0,5 min de sonicación/reposo. Los fragmentos de DNA obtenidos (de un tamaño comprendido entre 200 y 1000 pares de bases) se centrifugaron a 4°C durante 10 min a 13000 x g. Se midió la concentración de DNA del sobrenadante (100-150 µg de cromatina por IP) y éste se diluyó diez veces en tampón de dilución de ChIP conteniendo inhibidores de proteasas (*Complete, Roche*). Para reducir las uniones inespecíficas, las muestras se incubaron durante 45 min a 4°C con agitación suave en presencia de proteína A/G Plus agarosa. Tras centrifugar durante 5 min a 200 x g, se añadió a los sobrenadantes el anticuerpo específico frente a la proteína de interés (2-3 µg) y se incubó durante toda la noche a 4°C con rotación suave. Como control negativo se realizaron incubaciones en ausencia de anticuerpo primario, y como control positivo se utilizaron alícuotas de los extractos previas a su incubación con el anticuerpo primario (DNA total o *input*). Tras añadir una nueva alícuota de A/G Plus agarosa, se realizó una incubación adicional de 1 h a 4°C con agitación suave. Las muestras se centrifugaron a 2000 x g durante 1 min a 4°C. Los precipitados conteniendo los complejos anticuerpo-proteína-DNA se lavaron durante 5 min con los siguientes tampones: tampón de lavado de baja fuerza iónica (SDS 0,1%, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 120 mM pH 8, NaCl 150 mM), tampón de lavado de alta fuerza iónica (SDS 0,1%, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 120 mM pH 8, NaCl 500 mM), tampón de lavado conteniendo LiCl (LiCl 0,25 M, NP40 1%, deoxicolato 1%, EDTA 1 mM, Tris-HCl pH 10 mM 8.1) y tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM). Finalizados estos lavados, los complejos se extrajeron con tampón de elución (SDS 1%, NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, 200 µl por condición) durante 15 min con agitación, tras lo cual fueron centrifugados a 2000 x g durante 1 min. El proceso de extracción se repitió una vez más y todos los eluidos se combinaron en un mismo tubo. A continuación, se incubaron durante 4 h a 65°C en NaCl 200 mM para romper los entrecruzamientos DNA-proteína y liberar el DNA, incorporándose en este paso los DNA *input*. Con el fin de eliminar las proteínas, las

muestras se incubaron durante 1 h a 45°C en una solución conteniendo EDTA 10 mM, Tris HCl 40 mM pH 6.5 y 40 µg/ml de Proteinase K (*Roche*). Finalmente, el DNA inmunoprecipitado se purificó usando columnas *ChIP DNA Clean & Concentrator* (*Zymo Research*) diseñadas para la purificación de muestras conteniendo SDS. La cuantificación de la unión proteína-DNA se hizo mediante PCR en tiempo real empleando un equipo *StepOne* (*Applied Biosystems*) usando cebadores específicos para cada región analizada (Tabla M.7). Los resultados se muestran como porcentaje respecto al input de DNA de la inmunoprecipitación menos el porcentaje respecto al input de DNA del control sin anticuerpo.

Genes	Secuencia <i>primers</i> (5'--3')		T <sup>a</sup>
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
<b>P16</b>	GGCACTCCCAGCAAGTAGAT	CACAAACGTGCCTCCTATACA	
<b>P21</b>	TTTGTGTCCTCGCCCTCAT	ACGCACGTACACAGACACA	
<b>IL6</b>	AGCCTCTTATTCATGTGTGTGTG	ACTTGAGCATGTCTTGATGGG	
<b>IL1</b>	GCATCTCAAAGGTGACACGG	CGAGTCTCTGCAGGTTCACT	
<b>TNF</b>	CCAGACACTCACCTCATCCC	TGGAAGTGGCAGAAGAGGC	

**Tabla M.7.** Primers empleados para el análisis cuantitativo por qPCR de secuencias de DNA obtenidas en la inmunoprecipitación de cromatina.

### 30. Análisis de citoquinas mediante Bioplex

El tejido hepático se homogeneizó en tampón de lisis (*Bio-Rad*) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete, Roche*) en una proporción de 1 mg de tejido/4 µl de tampón. El tejido se homogeneizó y se centrifugó a 500 x g durante 15 min, almacenándose el sobrenadante a -80°C. En el momento de su uso, se determinó la concentración total de proteína en el sobrenadante y se diluyó con *bioplex sample diluent* (*Bio-Rad*) a una concentración final de 300 µg/ml. El plasma sanguíneo se obtuvo como se ha indicado en el apartado 27 anterior y se diluyó en una proporción 1:4 en

*bioplex sample diluent*. El contenido en citoquinas se analizó en el equipo *Bio-Plex Multiplex immunoassays (Bio-Rad)* usando partículas magnéticas luminescentes en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias de la Universidad de Extremadura.

### **31. Análisis estadístico**

Todos los experimentos descritos en esta Tesis Doctoral se han realizado empleando al menos dos réplicas biológicas con al menos dos replicas experimentales de cada condición (si bien la mayoría de los datos mostrados resultan de la realización de tres réplicas). Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar (s.d.) y se han analizado mediante el test T de *Student* para muestras no pareadas. La generación de gráficos y la significación estadística han sido obtenidas empleando el software *GraphPad 6.0*.



# CAPÍTULO I

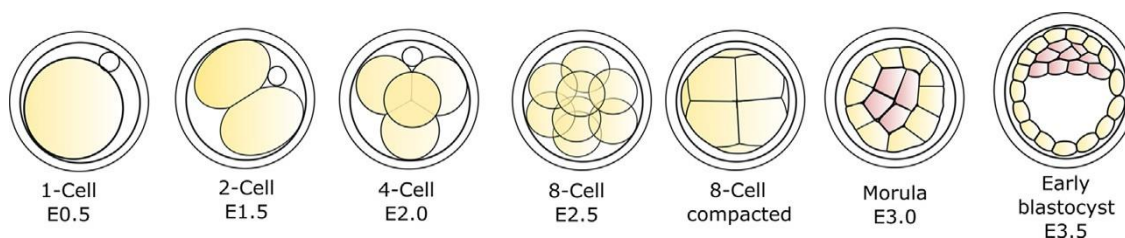


# INTRODUCCIÓN I

### 1. Embriogénesis en el ratón

La embriogénesis es un proceso altamente complejo y dinámico que implica numerosas redes de regulación transcripcional cuyo fin es controlar las divisiones celulares y la determinación del destino de los distintos linajes que progresivamente van surgiendo. En dichas especificaciones intervienen numerosos factores de transcripción así como gradientes de concentración de moléculas y de compuestos químicos difusibles, conocidos como morfógenos (Christian, 2012).

La fusión del oocito y del espermatozoide tiene lugar en el oviducto, en el proceso conocido como fecundación. El cigoto resultante tras esta fusión experimenta una serie de divisiones mitóticas sucesivas durante las cuales el tamaño neto del embrión se mantiene invariable, generándose así células (blastómeros) cada vez más pequeñas. (Aiken, Swoboda, Skepper, & Johnson, 2004). El desarrollo embrionario temprano se caracteriza por una serie de divisiones celulares rápidas que se dan dentro de la cubierta glicoproteica denominada zona pelúcida, en la etapa conocida como *cleavage*. Durante esta etapa, los blastómeros originados son morfológicamente indistinguibles tanto en tamaño como en forma (Chazaud & Yamanaka, 2016).



**Figura I1.1.** Esquema del desarrollo embrionario preimplantacional de mamíferos.

Los factores de transcripción Oct3/4 (Pou5f1), Sox2 y Nanog constituyen la "red de pluripotencia central" que regula el balance entre pluripotencia y diferenciación en el embrión. Estos factores se unen sinérgicamente a su propio promotor y a elementos potenciadores, estableciendo un circuito de autorregulación que mantiene a las células madre embrionarias en un estado indiferenciado (Boyer et al., 2005; Boyer et al., 2006). Esta red maestra de pluripotencia que incluye factores adicionales como Sall4, Klf4 y Stat3 y complejos epigenéticos silenciadores de la familia polycomb (PRC1 y PRC2) (Boyer et al., 2006) regula la expresión de dos grupos distintos de genes en ESCs (*Embryonic Stem Cells*). Por un lado activa genes relacionados con la autorrenovación y, por otro, reprime aquellos genes implicados en diferenciación celular (Jaenisch & Young, 2008).

En el estadio de 8 células, el embrión preimplantacional de ratón inicia dos procesos morfogénicos cruciales, a saber: la compactación y polarización (Saiz & Plusa, 2013). La compactación es un evento celular en el que cada blastómero se aplana para aumentar los contactos célula-célula, minimizando de este modo el área de la superficie del embrión. La polarización es el mecanismo mediante el cual se establece un eje ápico-basal en cada blastómero. Está ampliamente aceptado que la división 8-16 constituye la primera división asimétrica de la embriogénesis, la cual es crucial para el establecimiento de la polaridad en el embrión (M. H. Johnson & Ziomek, 1981). Tras esta ronda de división, se produce el primer evento de diferenciación celular generándose dos tipos celulares: El primero lo forman las células polares, que al estar posicionadas en la parte más externa del embrión carecen de contacto célula-célula por la zona apical de su superficie. Estos blastómeros se convertirán en trofotodermo (TE) en el blastocisto, dando lugar a la placenta tras la implantación. El segundo tipo lo constituyen las células que se localizan en el interior del embrión; éstas son apolares ya que mantienen contactos célula-célula en toda su superficie. Esta segunda población dará lugar a la masa celular interna (*Inner Cell Mass*, ICM) que se desarrollará en el epiblasto (EPI) y en el endodermo primitivo (PE), dando lugar posteriormente al feto y al saco vitelino, respectivamente (Kojima, Tam, & Tam, 2014).

En el embrión en el estadio de mórula, las células aún conservan plasticidad de linaje, pero el establecimiento de la polaridad resulta indispensable para restringir la expresión de factores de transcripción específicos que promoverán diferentes destinos celulares (Suwińska, Czołowska, Ożdżeński, & Tarkowski, 2008). Después de la gastrulación, todas las células tienen ya definido a qué capa germinal en particular van a pertenecer y sólo las células germinales mantienen la capacidad de formar una célula totipotente tras la fertilización (Jared et al., 2012).

Aún no se conoce de forma precisa el mecanismo que controla la división asimétrica en el embrión de 8 células. Una de las teorías que trataron de explicar el posicionamiento externo/interno de los blastómeros durante la primera división asimétrica, argumentaba que se debía a la diferente orientación del huso en la división celular: cuando el huso mitótico es perpendicular a la superficie del embrión, una célula hija será interna y la otra externa; cuando es paralelo, ambas células hijas mantendrán posición externa. Sin embargo, estudios de imagen *in vivo* (Youngjo Kim et al., 2011; Yamanaka, Lanner, & Rossant, 2010) demostraron que las orientaciones de división de la mayoría de los blastómeros de 8 células son oblicuas al embrión, en lugar de perpendiculares o paralelas. Además, ambas células hijas pueden reemplazarse en una posición externa poco después de la división (Yamanaka et al., 2010) (Youngjo Kim et al., 2011). Esto sugiere que existe un proceso de determinación celular que está involucrado en el establecimiento de la posición de los blastómeros en la división asimétrica que genera distintos tipos celulares.

## **2. Diferenciación de las células madre embrionarias**

Las células madre embrionarias (*Embryonic Stem Cells*, ESCs) tienen dos propiedades únicas: la autorrenovación y la pluripotencia (Martin J Evans & Kaufman, 1981). La pluripotencia de las ESCs está determinada por la acción de diferentes vías de

señalización que responden a estímulos, factores de transcripción expresados intrínsecamente y a complejos que modulan el estado epigenético. La red transcripcional que gobierna estos procesos en ESCs está dirigida por los principales reguladores de la pluripotencia como son Oct4, Sox2 y Nanog (Boyer et al., 2005).

Oct4 se considera el regulador maestro de la totipotencia, controlando la expresión de numerosos factores de pluripotencia, así como su propia autorregulación (Pesce & Schöler, 2001). Oct4 tiene la capacidad de unirse al DNA en forma de monómero, de homodímero, o de heterodímero con Sox2, reclutando factores adicionales para establecer mecanismos de regulación de la expresión génica mediante los cuales llega a interactuar con más de 50 factores de transcripción en ESCs (van den Berg et al., 2010). Oct4 coopera con Sox2 para regular los niveles de expresión de otros genes importantes en autorrenovación y pluripotencia de ESCs como Nanog. Oct4 pertenece a la familia de proteínas con homeodominio POU y está codificada por el gen *Pou5f1*. Es ampliamente conocido por estar expresado en células indiferenciadas tales como ESCs, células de carcinoma embrionario (*Embryonic Carcinoma Cells*, ECC), epiblasto pluripotente y células germinales embrionarias (*Embryonic Germinal Cells*, EGC) (Cauffman, Van de Velde, Liebaers, & Van Steirteghem, 2004; Rosner et al., 1990). Se ha comprobado que la expresión de Oct4 es esencial para el mantenimiento de la totipotencia en células madre embrionarias, de tal manera que los embriones deficientes en la expresión de Oct4 no forman masa celular interna pluripotente ni trofotodermo diferenciado (Nichols et al., 1998). Además, su inhibición en ESCs de ratón (mESCs) conlleva la regulación positiva de genes del trofotodermo como *Cdx2*, mientras que su sobreexpresión da origen a endodermo primitivo y a mesodermo (Niwa, Miyazaki, & Smith, 2000). Diversos estudios sobre embriogénesis han demostrado que los niveles exactos de Oct4 determinan el destino de las ESCs ya que es un regulador clave en el mantenimiento de la autorrenovación de células madre. Por otra parte, es ampliamente conocido que Oct4 juega un papel crucial en la tumorigénesis y en la metástasis tumoral. Este marcador de células madre se encuentra sobreexpresado en numerosos cánceres humanos como los

de vejiga, próstata y mama (Atlasi, Mowla, Ziaee, & Bahrami, 2007; Ben-Porath et al., 2008; Liu et al., 2011).

En células de carcinoma embrioide humano, se ha visto que la reducción de los niveles de expresión de Oct4 tras inducir diferenciación, está mediado por el receptor AhR. Este receptor se une a su secuencia consenso XRE localizada en un retrotransposón de la familia *Alu* presente en el promotor de *OCT4* (OCT4X36S), el cual es transcrito por la RNA Polimerasa III. Los transcritos generados, vía maquinaria de degradación de miRNAs, reducen los niveles de mRNA de *OCT4* promoviendo diferenciación celular (Morales-Hernandez et al., 2016).

Sox2 se expresa en la ICM y en el ectodermo extraembrionario de los blastocistos preimplantacionales (Avilion et al., 2003). Embriones en los que se ha interferido la expresión de Sox2, resultaron incapaces de formar una ICM pluripotente y en su lugar se activó diferenciación principalmente a trofotodermo. Además, se ha comprobado que la sobreexpresión de Oct4 es capaz de rescatar dicho fenotipo, de manera Sox2 no sólo es crítico para el mantenimiento de la expresión de Oct4 sino que también es necesario para el mantenimiento de las propiedades de las células madre.

Nanog es el tercer miembro de la red central de pluripotencia en ESCs. La expresión de Nanog es indispensable para la formación de una ICM pluripotente (Mitsui et al., 2003; Silva et al., 2009) y a la vez necesaria para el mantenimiento de la identidad de las ESCs (I. Chambers et al., 2003). Los heterodímeros Oct4/Sox2 se unen al promotor proximal de *Nanog* y regulan su expresión en ESCs (Kuroda et al., 2005). El patrón de expresión de Nanog durante el desarrollo temprano de mamíferos es variable y complejo (Nichols, Silva, Roode, & Smith, 2009). Resulta bastante heterogéneo hasta la formación del blastocisto, pero una vez constituidos los diferentes linajes de la ICM, Nanog se expresa en el epiblasto (I. Chambers et al., 2003). Oct4 y Sox2 interaccionan con numerosos vías de señalización que regulan la expresión de los programas transcripcionales de diferenciación y pluripotencia (X. Chen et al., 2008).



Conjuntamente, estos tres factores actúan para mantener el estado indiferenciado de las células. La transcripción de sus respectivos genes requiere el reclutamiento de al menos uno de los tres (X. Chen et al., 2008). Adicionalmente a lo ya indicado, se ha comprobado que en procesos de diferenciación celular, la represión de NANOG está también mediada por AhR a través del mismo mecanismo de regulación dirigido por un retrotransposón *Alu* ubicado en su promotor (NANOGX45S) (Morales-Hernández et al., 2016).

### **3. Primera decisión de destino: Masa celular interna (ICM) y TE (Trophoblasto)**

La primera decisión de destino que tiene lugar durante el desarrollo embrionario es la determinación del linaje del trofoblasto, que generará la placenta, y la de la masa celular interna (ICM) que dará lugar al resto del embrión.

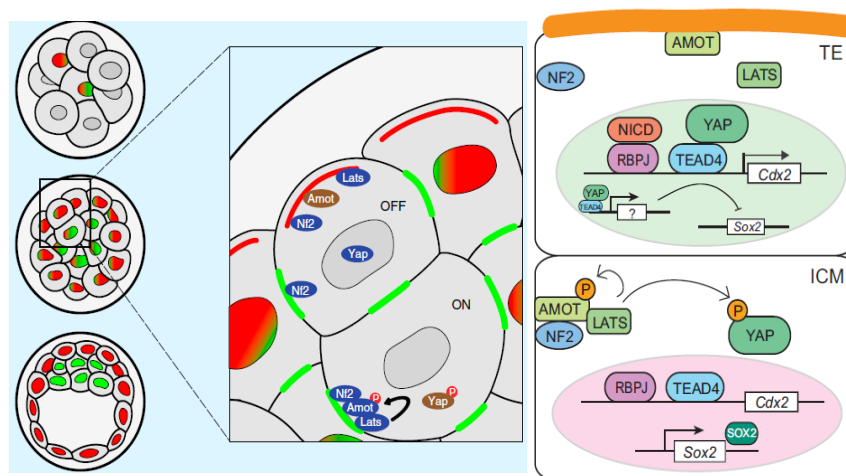
La ruta de señalización denominada Hippo constituye una cascada de quinasas conservada evolutivamente desde *Drosophila melanogaster* hasta mamíferos. Hippo está implicada en la regulación del número de células durante el desarrollo y en la homeostasis de tejidos a través del control de la proliferación, diferenciación y muerte celular (F.-X. Yu & Guan, 2013). Es además crucial para la renovación de las células madre y para el mantenimiento de la estabilidad genómica. Adicionalmente, esta ruta tiene capacidades únicas relacionadas con la estructura de los tejidos, incluyendo el control de la polaridad celular, con el reconocimiento de tensiones mecánicas provocadas por el microentorno y con el control del tamaño y de la forma de los órganos (Nishio et al., 2013).

La polaridad que se establece en el embrión tras la primera división asimétrica transduce la señalización a los factores de transcripción encargados de regular la determinación de destino a través de la ruta Hippo (Leung & Zernicka-Goetz, 2013). YAP es el principal efector de esta vía de señalización actuando como un coactivador

transcripcional que se localiza en el núcleo cuando está hipofosforilado con el fin de activar la expresión de sus genes diana. Se ha demostrado que YAP puede alterar la expresión génica específica de linaje en el embrión, pero no puede afectar el establecimiento de células externas/internas, lo que sugiere que la cascada de señalización YAP funciona con posterioridad a la decisión de la posición celular.

En las células polares del embrión se expresan genes específicos que determinan su diferenciación hacia linaje de trofotodermo, de manera relevante *Cdx2* (Blij, Frum, Akyol, Fearon, & Ralston, 2012) (G. Wu et al., 2010). Se ha demostrado que la cascada de señalización Hippo/YAP controla la expresión de CDX2 específica del TE (Cockburn (Cockburn, Biechele, Garner, & Rossant, 2013; Hirate & Sasaki, 2014) y que la regulación de YAP es necesaria y suficiente para la especificación de linaje en el TE (Nishioka et al., 2009). La ruta Hippo se encarga de mantener fosforilado a YAP a través de la actividad de las quinasas citosólicas Lats1/2, miembros de la familia AGC-quinasa, que reconocen a YAP como sustrato. La forma fosforilada de YAP se mantiene en el citoplasma unida a chaperones 14-3-3 (Zhao, Li, Tumaneng, Wang, & Guan, 2010; Zhao et al., 2007). En las células polarizadas esto no ocurre, de manera que YAP se transloca al núcleo donde se une al factor de transcripción TEAD4 y activa la expresión de *Cdx2*. La activación específica de YAP en estos blastómeros se debe a la inhibición de la ruta Hippo dependiente de polaridad. La proteína Amot de la familia de las angiomotinas coopera con NF2 en el establecimiento de un interruptor molecular que mantiene activa la ruta Hippo en las células internas (que presentan uniones adherentes en toda su superficie) mientras que la inactiva en las células polarizadas (Cockburn et al., 2013; Hirate & Sasaki, 2014; Leung & Zernicka-Goetz, 2013). El vínculo entre la polaridad y la activación diferencial de Hippo se debe al “secuestro” de Amot por parte de la maquinaria de polarización celular en el dominio apical de las células externas, donde se mantiene unida a F-actina. En las células polarizadas, los niveles de F-actina y de miosina son mayores que en el interior del embrión, donde Amot permanece unida a las uniones adherentes por su dominio amino. En este contexto, se recluta Nf2 y Amot es fosforilada por Last2 en su Ser176, lo que da

lugar al bloqueo de su unión a actina y a la estabilización del complejo de Last2-Nf2 con E-cadherina. Este complejo se encarga entonces de mantener a YAP fosforilado y excluido del núcleo (Cockburn et al., 2013). En las células externas, la unión de Amot a la actina del polo apical impide la formación de dicho complejo, con lo que la actividad Hippo se encuentra inhibida y las quinasas Lats incapaces de fosforilar a YAP, el cual se transloca al núcleo y se une a TEAD4 activando la expresión de Cdx2. Cdx2 se encarga entonces de promover la expresión de genes que especifican el linaje de trofotodermo a la vez que reprime los genes de ICM que inicialmente se expresaban en todas las células de la mórula como *Sox2*, *Oct4* y *Nanog* (Strumpf et al., 2005).



**Figura I1.2.** Esquema de la activación diferencial de la ruta Hippo durante la primera decisión de destino de la embriogénesis (Manzanares & Rodríguez, 2013).

En la ICM, *Sox2* se expresa antes que *Oct4* y *Nanog*, si bien no reprime la expresión de genes de TE (Wicklow et al., 2014). Sí parece existir consenso en cuanto al papel de *Oct4* en reprimir la expresión de genes de TE en la ICM (Nichols et al., 1998; Ralston et al., 2010).

#### 4. Segunda decisión de destino: Epiblasto (EPI) y endodermo primitivo (PE)

La ICM ya constituida en el interior del blastocisto, comienza a activar dos programas transcripcionales diferentes en las células que la componen según un patrón de localización aleatoria conocido como “*salt and pepper*”. Así, se constituyen dos linajes celulares diferentes: las células que darán lugar al epiblasto (*Epiblast*, EPI) que expresan factores de pluripotencia como Nanog y Sox2 (Avilion et al., 2003; S. M. Chambers et al., 2009; Mitsui et al., 2003), y las que formarán el endodermo primitivo (*Primitive Endoderm*, PE), en las que se induce la expresión de los genes Gata6, Gata4, el receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa (*Platelet-Derived Growth Factor- $\alpha$* , PDGDa), Sox17 y Sox7 (Artus; Koutsourakis, Langeveld, Patient, Beddington, & Grosveld, 1999). Tras la inducción de ambos linajes, estos tipos celulares adoptan su localización correcta por una combinación de migración celular activa, inducción posicional y muerte celular programada de aquellas células mal posicionadas (Meilhac et al., 2009; Plusa, Piliszek, Frankenberg, Artus, & Hadjantonakis, 2008). En el blastocisto totalmente desarrollado, el EPI ocupa la zona más profunda de la ICM mientras que el PE se sitúa hacia la cavidad recubriendo la superficie de la ICM. Nanog se expresa de forma específica en las células del EPI y es indispensable para su determinación de destino. También se ha demostrado que las células del EPI son necesarias para la formación del PE, en el que además se requiere señalización vía Fgf4 (Frankenberg et al., 2011).

La embriogénesis es un proceso controlado por un complejo balance entre pluripotencia y diferenciación que se regula mediante la expresión dinámica de varios factores de transcripción. Comprender cómo estos factores coordinan ambos procesos a través de la inducción de distintos programas transcripcionales resulta crucial para entender la diferenciación que sufren las células madre, tanto durante el desarrollo como en las patologías resultantes de su desregulación.



# OBJETIVOS I

## OBJETIVOS I

---

Teniendo en cuenta los datos publicados que demuestran la implicación de AhR en procesos de diferenciación, y basándonos en resultados recientes que ponen de manifiesto el papel relevante de este receptor en pluripotencia y *stemness*, en este capítulo hemos analizado la implicación de AhR en la regulación del balance entre pluripotencia y diferenciación durante el desarrollo preimplantacional de embriones de ratón.

Para llevar a cabo dicho objetivo general, hemos utilizado embriones preimplantacionales de ratones *AhR*<sup>-/-</sup> y *AhR*<sup>+/+</sup> desde el estadio 0.5 d.p.d. hasta el 3.5 dpc. Se han abordado los siguientes objetivos parciales:

- Analizar la implicación de AhR en la regulación de la expresión y la localización de factores de pluripotencia a lo largo del desarrollo preimplantacional de embriones murinos.
- Estudiar el papel de AhR en la modulación de la ruta *Hippo* durante la primera ronda de diferenciación que tiene lugar en el estadio de mórula.
- Analizar si existen diferencias en las tasas metabólicas oxidativas y glucolíticas entre los embriones *AhR*<sup>-/-</sup> y *AhR*<sup>+/+</sup> relacionadas con su estado de diferenciación.
- Dilucidar la implicación de AhR en la segunda ronda de diferenciación que tiene lugar en la masa celular interna del embrión.

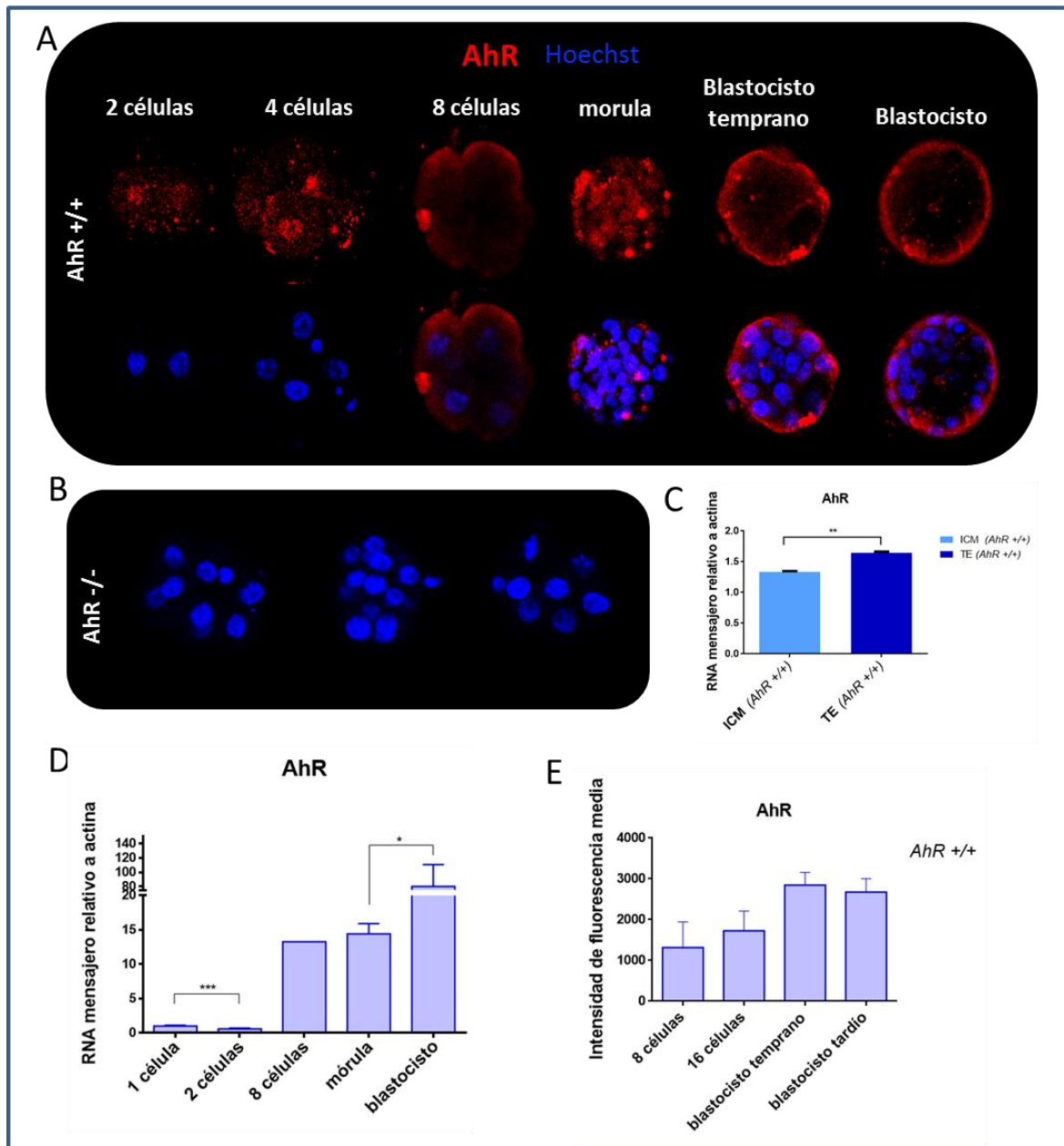




# RESULTADOS I

### 1. La expresión y la localización de AhR se encuentra modulada a lo largo del desarrollo embrionario

Para analizar el papel de AhR en la diferenciación embrionaria temprana, analizamos en primer lugar los niveles de expresión de AhR a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo. El análisis por inmunofluorescencia confocal indicó que AhR aumenta su nivel de expresión de manera significativa y constante a medida que la diferenciación progresa desde el estadio de 2 células hasta blastocisto (Figura RI.1A, E). Los embriones procedentes de ratones *AhR*<sup>-/-</sup>, por el contrario, no mostraron expresión alguna de AhR (Figura RI.1B). Dicho aumento de expresión a lo largo del desarrollo se observó también analizando los niveles de mRNA de receptor (Figura RI.1D). Los resultados mostraron que AhR sufre cambios en su localización durante la diferenciación embrionaria. Al comienzo de la primera división (*cleavage*), observamos una localización nuclear de AhR, translocándose fuera del núcleo en el estadio de 8 células y reapareciendo de nuevo en el núcleo en mórula y blastocisto; en éste último estadio, se expresó solamente en los blastómeros externos que darán lugar al trofectodermo (Figura RI.1A). Para corroborar que la expresión de AhR se restringe a los blastómeros que se diferencian a trofectodermo, separamos las células externas e internas que componen el blastocisto maduro mediante separación magnética activada y aislamos el RNA mensajero de ambas fracciones. El análisis mediante RT-qPCR reveló que AhR se expresa a un nivel significativamente mayor en los blastómeros externos del blastocisto (Figura RI.1C). De este modo, hemos determinado como, a nivel transcripcional, AhR aumenta su expresión a medida que avanza el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto.



**Figura RI.1 La expresión de AhR aumenta durante la diferenciación embrionaria.** (A) Inmunofluorescencia de AhR en las etapas embrionarias indicadas. Los embriones *AhR*<sup>+/+</sup> completos se tiñeron usando un anticuerpo AhR específico. La tinción de Hoechst se usó para marcar el núcleo celular. Se utilizó microscopía confocal para la detección. (B) embriones *AhR*<sup>-/-</sup> se usaron como control negativo (C) La expresión de mRNA de AhR se cuantificó por RT-qPCR usando RNA purificado de fracciones de TE o ICM previamente separadas por MACS. (D) La expresión de mRNA de AhR se cuantificó por RT-qPCR en embriones *AhR*<sup>+/+</sup> en las etapas de desarrollo indicadas usando RNA total. RT-qPCR se normalizó mediante la expresión de  $\beta$ -Actina y se representó como  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\* (E) La inmunofluorescencia se cuantificó calculando la intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada etapa de desarrollo. Los datos se muestran como media  $\pm$  sd.

AhR incrementa su expresión a medida que avanza el desarrollo embrionario temprano durante la diferenciación de las ESCs. Estos resultados sugieren que el receptor AhR debe tener un papel en embriogénesis que puede estar correlacionado con el aumento en sus niveles de expresión y con su localización a lo largo del proceso de diferenciación.

## 2. Los embriones carentes de AhR presentan sobreexpresión de los genes de pluripotencia en los estadios iniciales del desarrollo

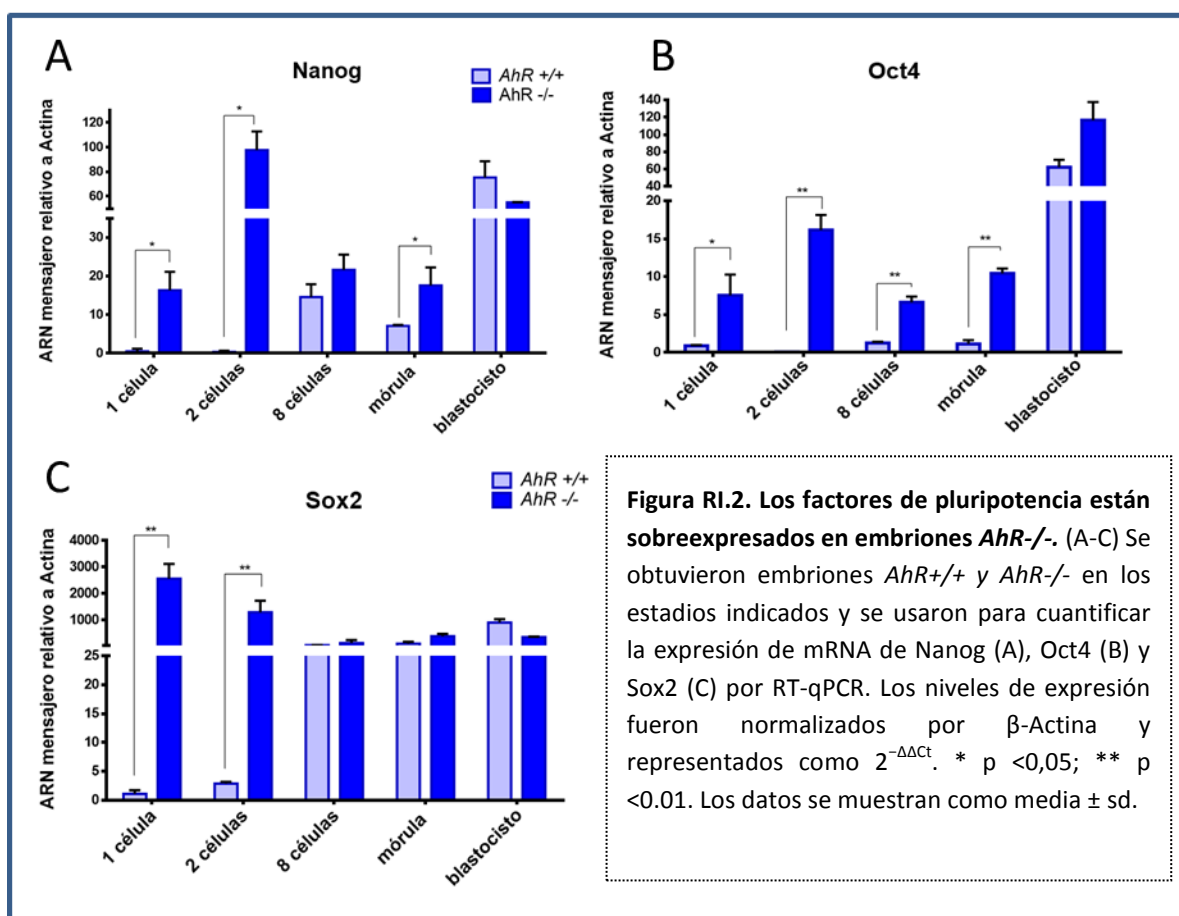
En las primeras etapas del desarrollo embrionario, es necesaria una reprogramación genética o “desdiferenciación” del cigoto con el fin de generar células totipotentes. Estas células madre embrionarias expresan genes que codifican para factores de transcripción encargados de mantener la plasticidad que les permita dar lugar a cualquier célula del organismo, entre ellos se encuentran los reguladores de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog.

Con la finalidad de evaluar si AhR participa en la regulación de la pluripotencia y la diferenciación durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, nos planteamos analizar los niveles de expresión de estos factores de pluripotencia a lo largo del desarrollo preimplantacional en embriones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup>.

Como se observa en la Figura RI.2, los embriones carentes de AhR presentaron unos niveles de expresión de mRNA de *Oct4* significativamente superiores a los de embriones de tipo silvestre antes de la fase de *cleavage* y hasta el estadio de mórula. Una vez formado el blastocisto final, los niveles de expresión de su RNA mensajero no mostraron diferencias significativas entre ambos genotipos (Figura RI.2B). *Nanog* mostró un patrón similar a *Oct4*, manteniendo niveles de mRNA superiores en embriones *AhR*<sup>-/-</sup> que en los *AhR*<sup>+/+</sup> hasta el estadio de mórula (Figura RI.2A). Los embriones *AhR*<sup>-/-</sup>

presentaron también una expresión significativamente más elevada del factor de pluripotencia *Sox2* al comienzo de la embriogénesis, normalizándose con respecto a los niveles de embriones *AhR*<sup>+/+</sup> de manera más temprana en el estadio de 8 células (Figura RI.2C).

Estos resultados sugieren que *AhR* reprime la expresión de genes relevantes en pluripotencia durante la embriogénesis temprana de ratón.

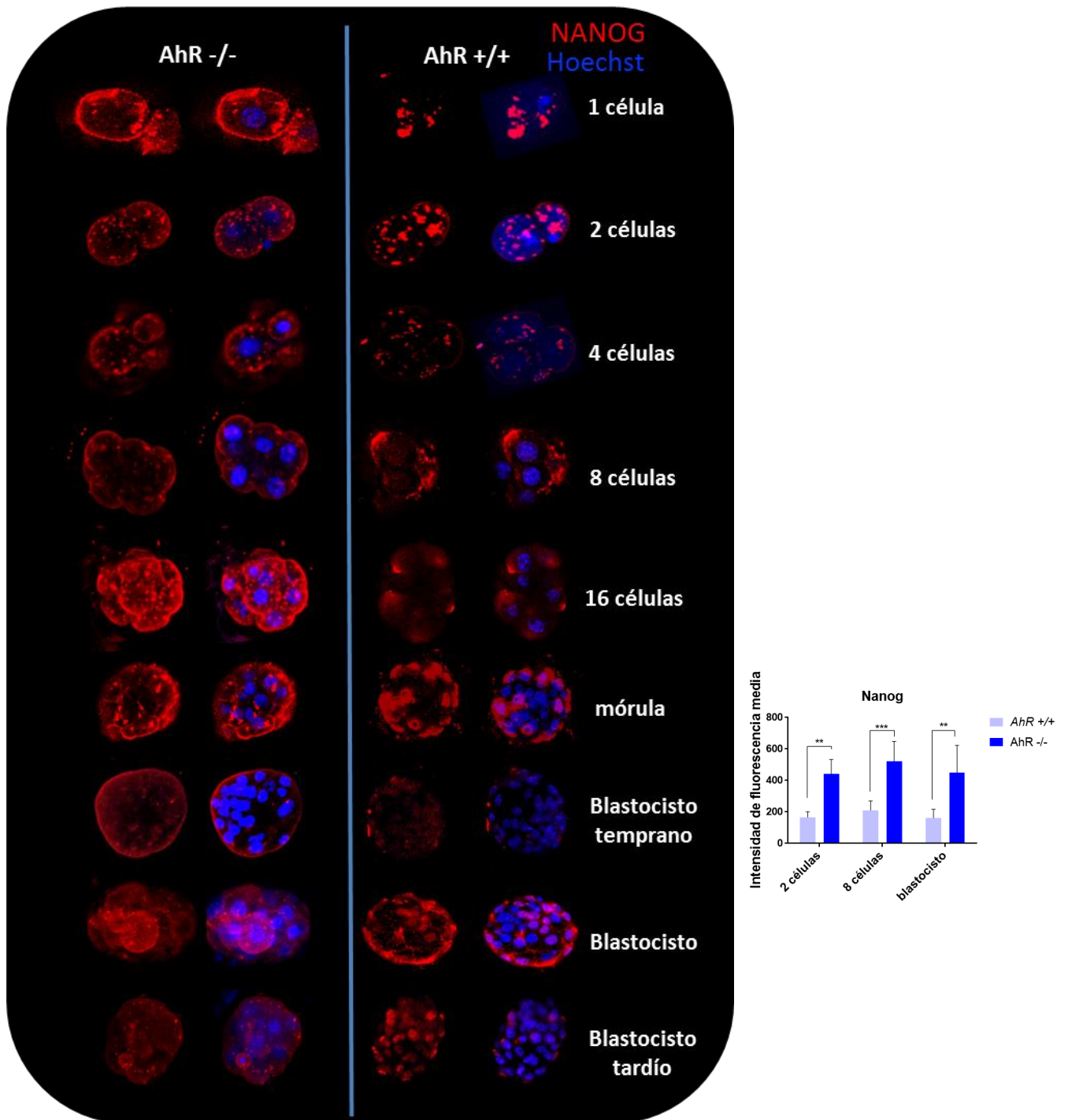


### **3. La localización de Nanog se ve modificada en función de la presencia de AhR durante el desarrollo embrionario preimplantacional**

En la embriogénesis, los distintos blastómeros que componen el embrión en desarrollo inician diferentes vías de diferenciación restringiendo su totipotencia. En el establecimiento de los distintos estados de diferenciación/pluripotencia, la posición de cada blastómero en el embrión es clave, ya que la polaridad tiene un papel fundamental en la primera decisión de destino. En este proceso intervienen también diferentes morfógenos e intermediarios moleculares que se polarizan en función del posicionamiento celular. Debido a esto, nos planteamos analizar posibles diferencias en la localización embrionaria de estos factores de pluripotencia.

En la Figura RI.3 podemos observar cómo la localización celular de Nanog a lo largo del desarrollo embrionario preimplantacional mostró diferencias dependiendo de la presencia de AhR. El patrón punteado y regular que presentó esta proteína en los primeros estadios en ambos genotipos, desde cigoto hasta 4 células, se mantuvo en los embriones *AhR*<sup>-/-</sup> hasta el estadio de 16 células. Mientras en los de tipo silvestre se observa una localización polarizada de Nanog que pasa a nuclear en el estadio de blastocisto, podemos observar una deslocalización de este factor de pluripotencia ante la ausencia de AhR.

**Estos resultados muestran que la localización de Nanog podría ser regulada de una forma dependiente de AhR durante la embriogénesis.**



**Figura R1.3. La distribución NANOG en el embrión se ve alterada en ausencia de AhR.** (A) Inmunofluorescencia de NANOG en las etapas embrionarias indicadas. Los embriones completos se tiñeron usando un anticuerpo específico. Hoechst se usó para teñir núcleos celulares. (B) La inmunofluorescencia se cuantificó calculando la intensidad de fluorescencia media (MFI). \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001. Los datos se muestran como media  $\pm$  sd.

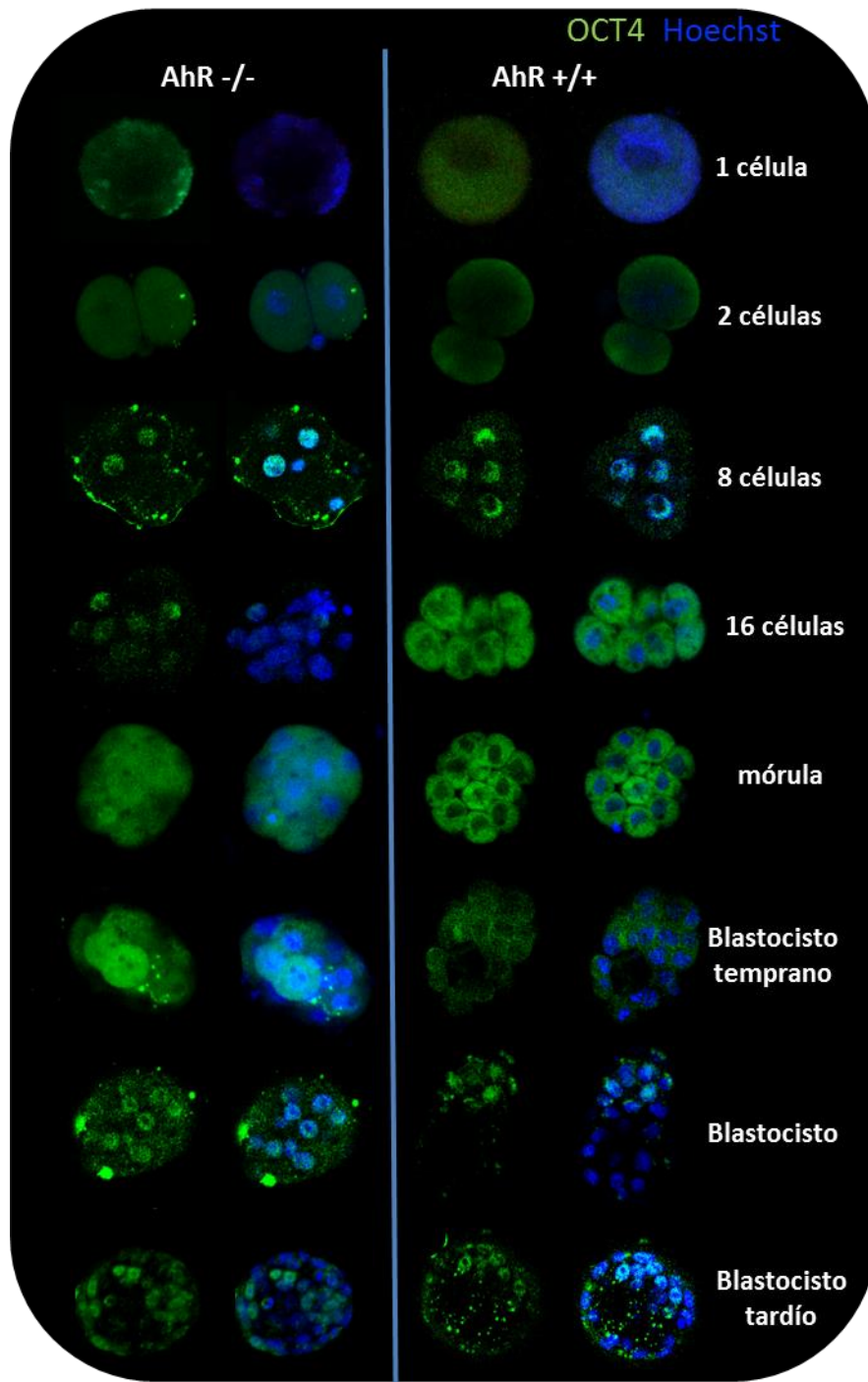
#### 4. La depleción de AhR altera el patrón proteico de Oct4 durante el desarrollo embrionario

Oct4 es un factor de transcripción clave en el mantenimiento de la totipotencia, ejerciendo un papel central en el mantenimiento del estado indiferenciado. Oct4 interacciona con numerosos factores para regular complejos mecanismos que coordinan las decisiones de destino en ESCs.

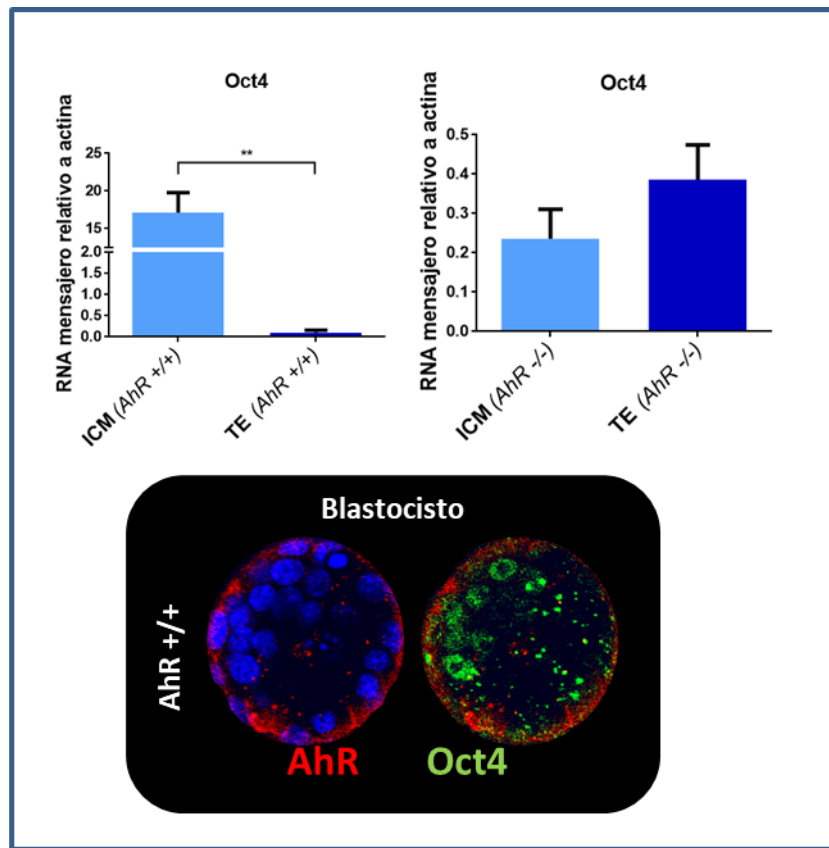
Para investigar si AhR afecta a la expresión y la localización de Oct4 a lo largo del desarrollo embrionario, realizamos inmunofluorescencia de embriones *whole mount* a los distintos estadios de desarrollo. Como se observa en la Figura RI.4, Oct4 se encontró excluido del núcleo celular desde el estadio de 16 células hasta el de blastocisto en embriones silvestres, en los que se localizó únicamente en los núcleos de la ICM. En los embriones carentes de AhR, la localización de Oct4 se mantuvo nuclear a lo largo de todo el desarrollo, pudiéndose observar como su nivel de expresión no disminuyó en los blastómeros externos. Para confirmar este resultado, decidimos analizar la expresión de *Oct4* a nivel de mRNA en los blastómeros de la masa celular interna y del trofotodermo de blastocistos de ambos genotipos. Encontramos que en los embriones *AhR*<sup>-/-</sup> no presentaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *Oct4* entre los blastómeros externos e internos, al contrario de lo que sucede en los embriones *AhR*<sup>+/+</sup> (Figura RI.5). Además, la doble inmunofluorescencia para Oct4 y AhR en blastocistos reveló un patrón excluyente de expresión, con Oct4 localizado en los núcleos de las células de la ICM mientras que Oct4 se ubicó en las del trofotodermo.

El hecho de que Oct4 muestre un patrón de localización opuesto al de AhR sugiere que posiblemente este receptor actúe ejerciendo una regulación negativa sobre Oct4 para regular el proceso de diferenciación.





**Figura RI.4 La falta de AhR altera la distribución celular de Oct4 durante la embriogénesis.** Inmunofluorescencia de Oct4 en las etapas embrionarias indicadas. Los embriones completos se tiñeron usando un anticuerpo específico. Hoechst se usó para teñir los núcleos celulares.



**Figura RI.5. La expresión de Oct4 no se restringe a la masa celular interna en ausencia de AhR.** Expresión diferencial de Oct4 entre masa celular interna (ICM) y Trofoectodermo (TE). RT-qPCR en blastocistos AhR-wt y AhR -KO. El nivel de expresión de Actina se utilizó para normalizar los niveles de expresión ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

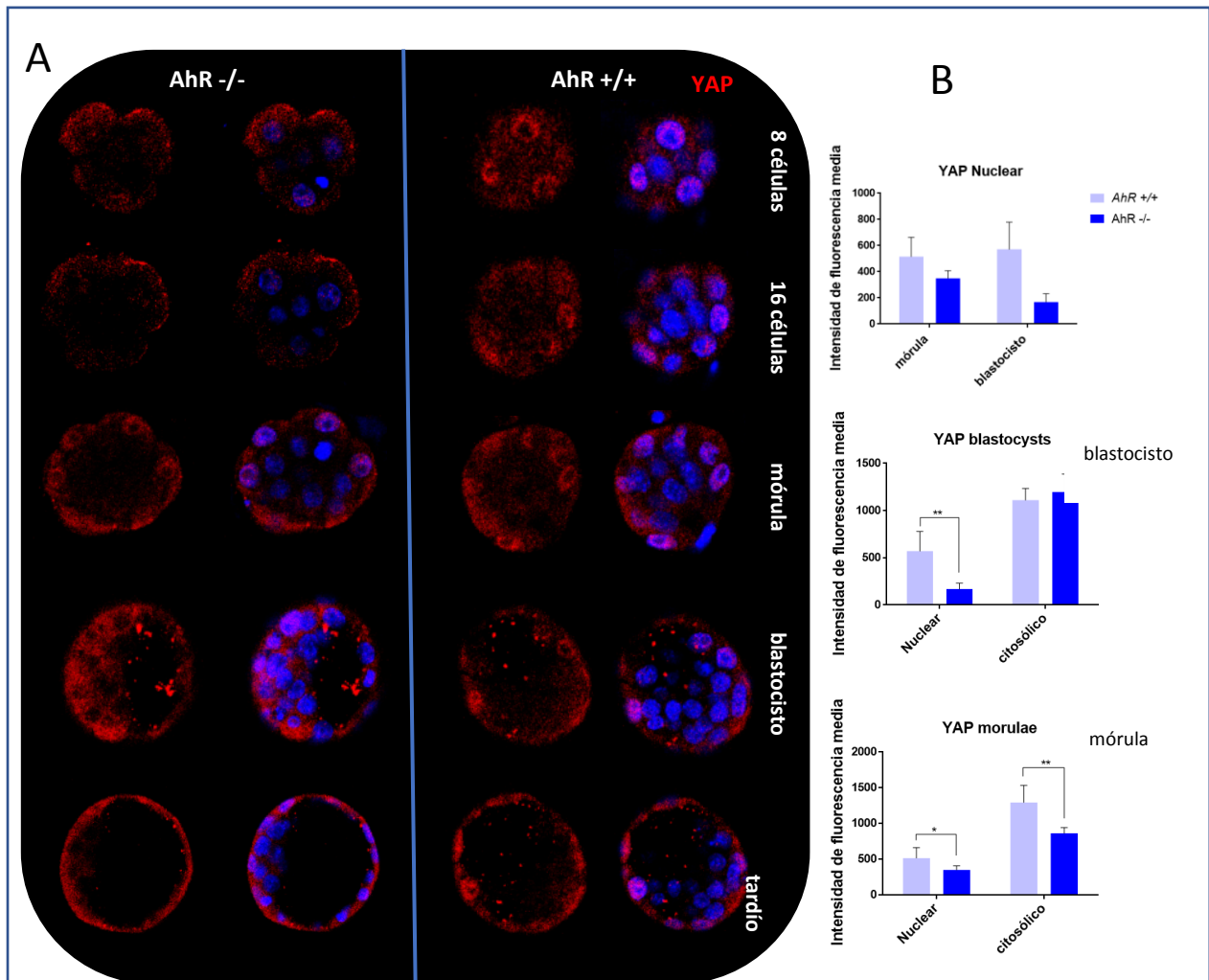
Estos resultados indican que AhR participa en la regulación de la localización, y posiblemente de la actividad, del factor de pluripotencia Oct4. El receptor de aril hidrocarburos muestra un patrón de localización opuesto a Oct4 a lo largo del desarrollo, lo que sugiere una posible regulación negativa del segundo por el primero.

## 5. La ruta *Hippo* se encuentra sobreactivada en embriones *AhR*<sup>-/-</sup>

Como se ha comentado anteriormente, la ruta Hippo transmite señales que regulan la polaridad que se establece en el embrión desde el estadio de 16 células hasta el de mórula con el fin de activar los programas de expresión génica tras la primera decisión de destino. En los blastómeros externos, la ruta Hippo es reprimida por la polaridad celular, de modo que YAP deja de estar fosforilado y se transloca al núcleo, activando la expresión de Cdx2 y determinando diferenciación a trofotodermo. En base a ello, nos planteamos si AhR podría actuar en la diferenciación que tiene lugar en el embrión a través de la ruta Hippo.

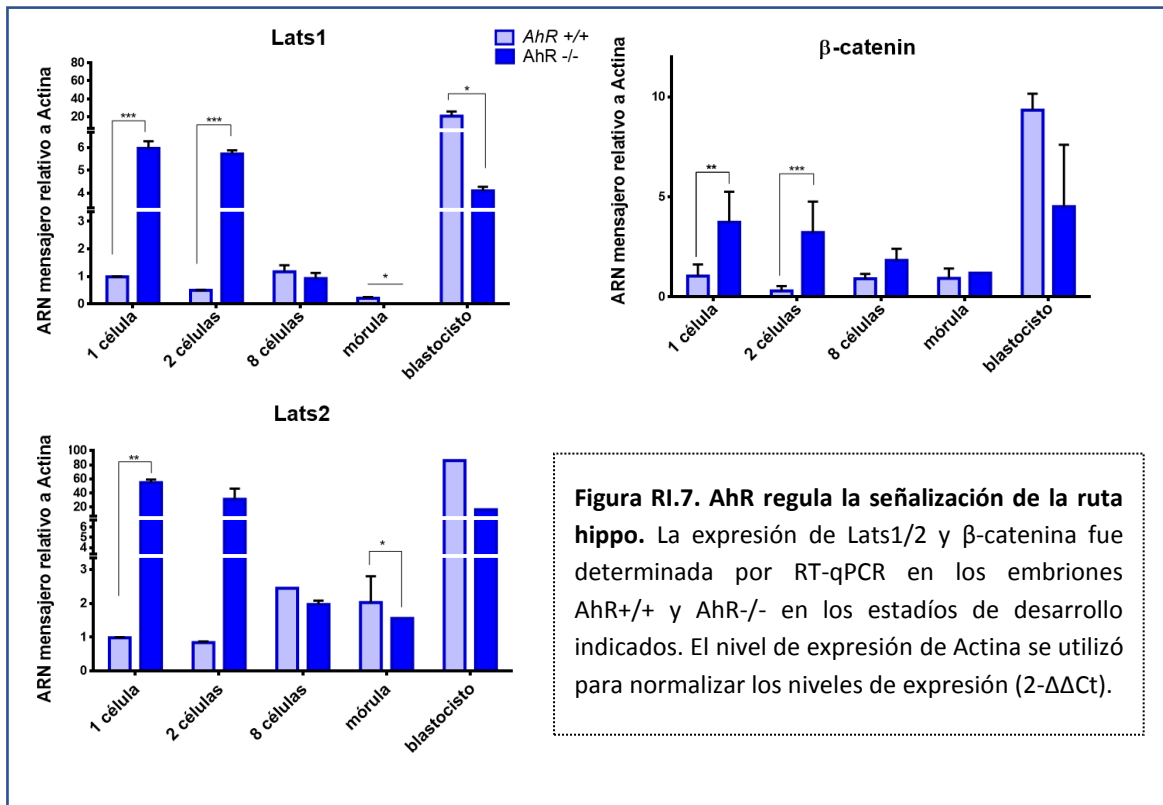
En primer lugar, analizamos mediante inmunofluorescencia la localización del efector de esta ruta YAP (Figura RI.6). Pudimos comprobar la existencia de notables diferencias en cuanto a su localización en función de la presencia de AhR. Los embriones *AhR*<sup>-/-</sup> mostraron exclusión nuclear de YAP durante la mayoría de las etapas de desarrollo analizadas; por contra, los embriones *AhR*<sup>+/+</sup> presentaron una localización marcadamente nuclear desde 8 a 16 células. En embriones *AhR*<sup>-/-</sup>, YAP se mantuvo fuera del núcleo incluso en blastocisto, cuando ya debería haberse definido el destino del trofotodermo.

Para continuar el análisis de la ruta Hippo en embriones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup>, comprobamos mediante RT-qPCR la expresión de las quinasas responsables de la fosforilación de YAP, Lats1/2 (Figura RI.7). Encontramos que la expresión de estos genes fue significativamente mayor en los embriones carentes de AhR al principio del desarrollo embrionario. Asimismo,  $\beta$ -catenina, uno de los componentes del complejo que se localiza en las uniones adherentes donde la proteína Amot es retenida, se encontró sobreexpresada en los estadios iniciales de desarrollo de los embriones *AhR*<sup>-/-</sup>.



**Figura RI.6. En ausencia de AhR disminuye la localización nuclear de YAP. A)** Análisis mediante inmunofluorescencia de YAP. Microscopía confocal. **B)** Medida de fluorescencia presente en núcleo, blastocisto total y mórula total mediante Confocal Olympus.

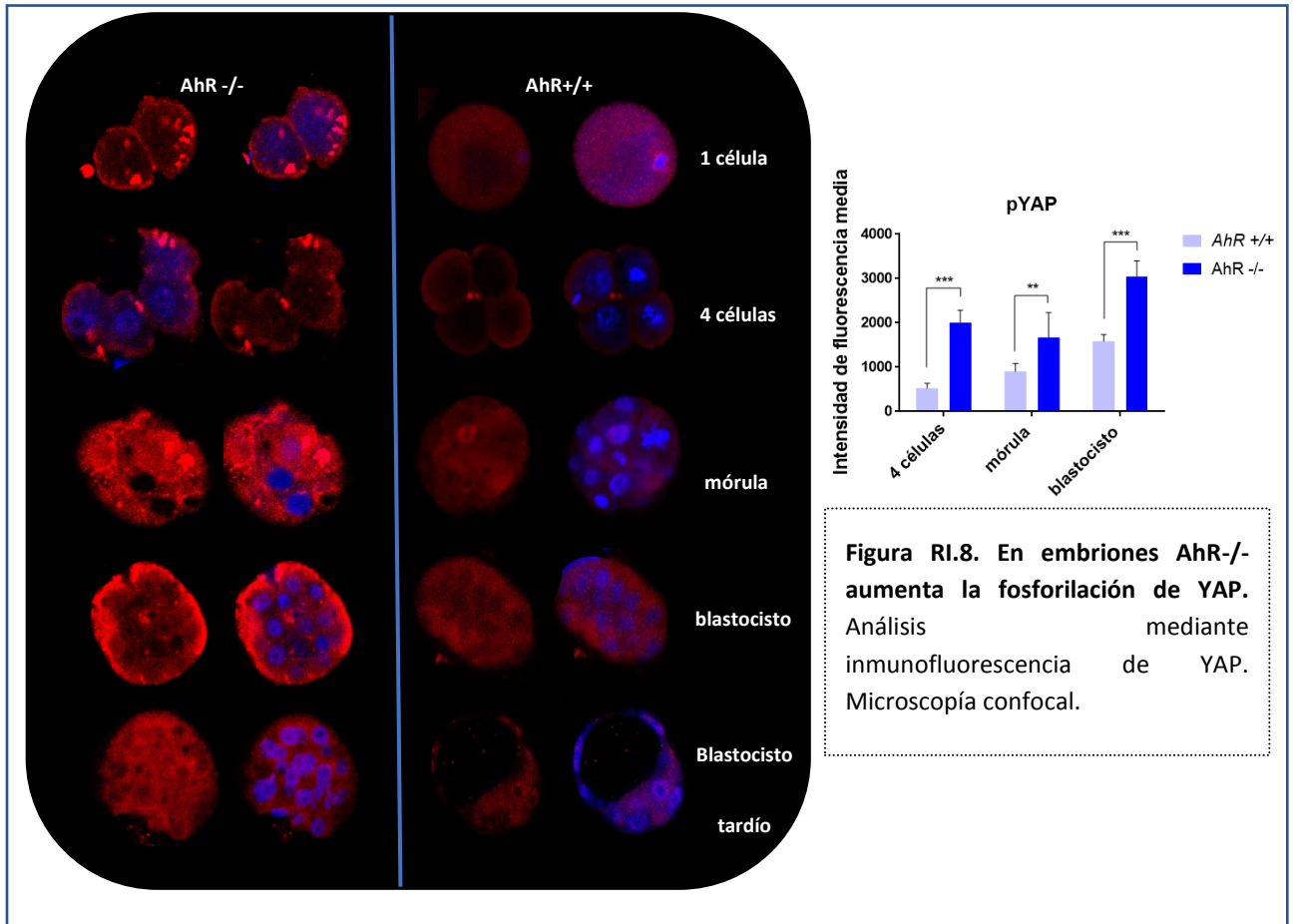
Para confirmar este aumento de actividad de la ruta Hippo en embriones *AhR*<sup>-/-</sup>, medimos los niveles de YAP fosforilado (p-YAP) mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo fosfoespecífico. El análisis mediante microscopía confocal reveló un nivel de proteína fosforilada significativamente mayor en los embriones *AhR*<sup>-/-</sup> que en los *AhR*<sup>+/+</sup> (Figura RI.8). A continuación, analizamos los niveles de mRNA de *Cdx2* en mórulas *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> por ser esta proteína la diana transcripcional de YAP que activa el programa de trofectodermo en la primera decisión de destino en el embrión. Los resultados indicaron

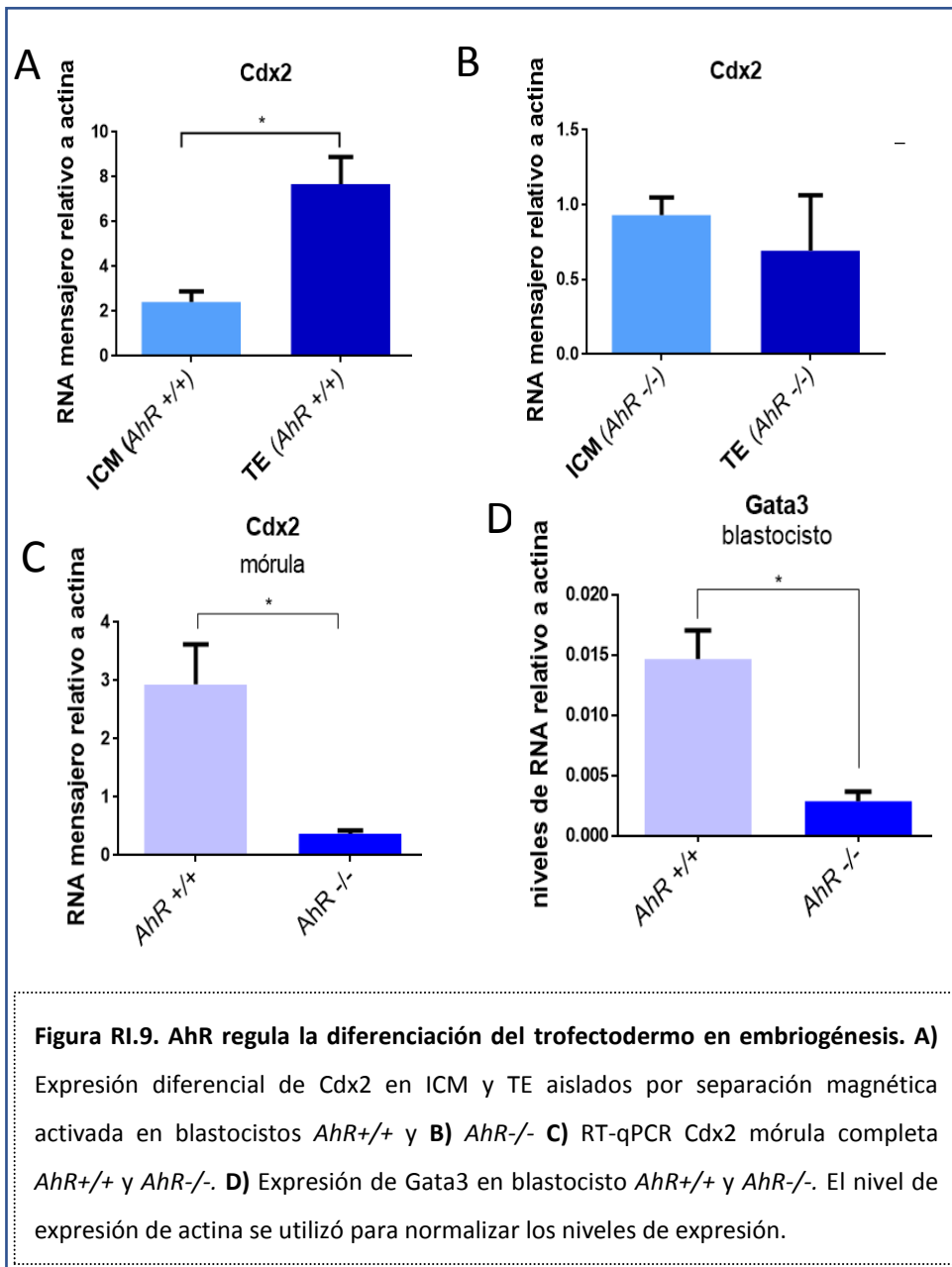


que *Cdx2* se expresa en menor nivel en los embriones *AhR*<sup>-/-</sup> que en los *AhR*<sup>+/+</sup>, confirmando una mayor actividad de la ruta Hippo en ausencia de AhR, la cual es coherente con una retención más acusada de YAP en el citosol (Figura RI.9). Además, el análisis de los niveles de expresión del mRNA de *Cdx2* en las fracciones ICM y TE mostró la ausencia de diferencias significativas entre blastómeros externos e internos en blastocistos *AhR*<sup>-/-</sup>. Por el contrario, *Cdx2* se expresó a mayor nivel en los blastómeros del trofotodermo en blastocistos *AhR*<sup>+/+</sup>, confirmando la implicación de AhR en la inactivación diferencial de la ruta Hippo en función de la polaridad del embrión.

Adicionalmente, los niveles de mRNA del marcador de trofotodermo *Gata3* fueron significativamente mayores en blastocitos *AhR*<sup>+/+</sup>, lo que confirma que la ausencia de AhR genera un retraso en la diferenciación embrionaria preimplantacional (Figura RI.9).

AhR está implicado en la regulación de la diferenciación embrionaria a través de la ruta Hippo. Este receptor actúa disminuyendo la actividad de esta ruta de señalización, promoviendo así la actividad de YAP como activador transcripcional que permite la diferenciación en la primera decisión de destino de la embriogénesis.





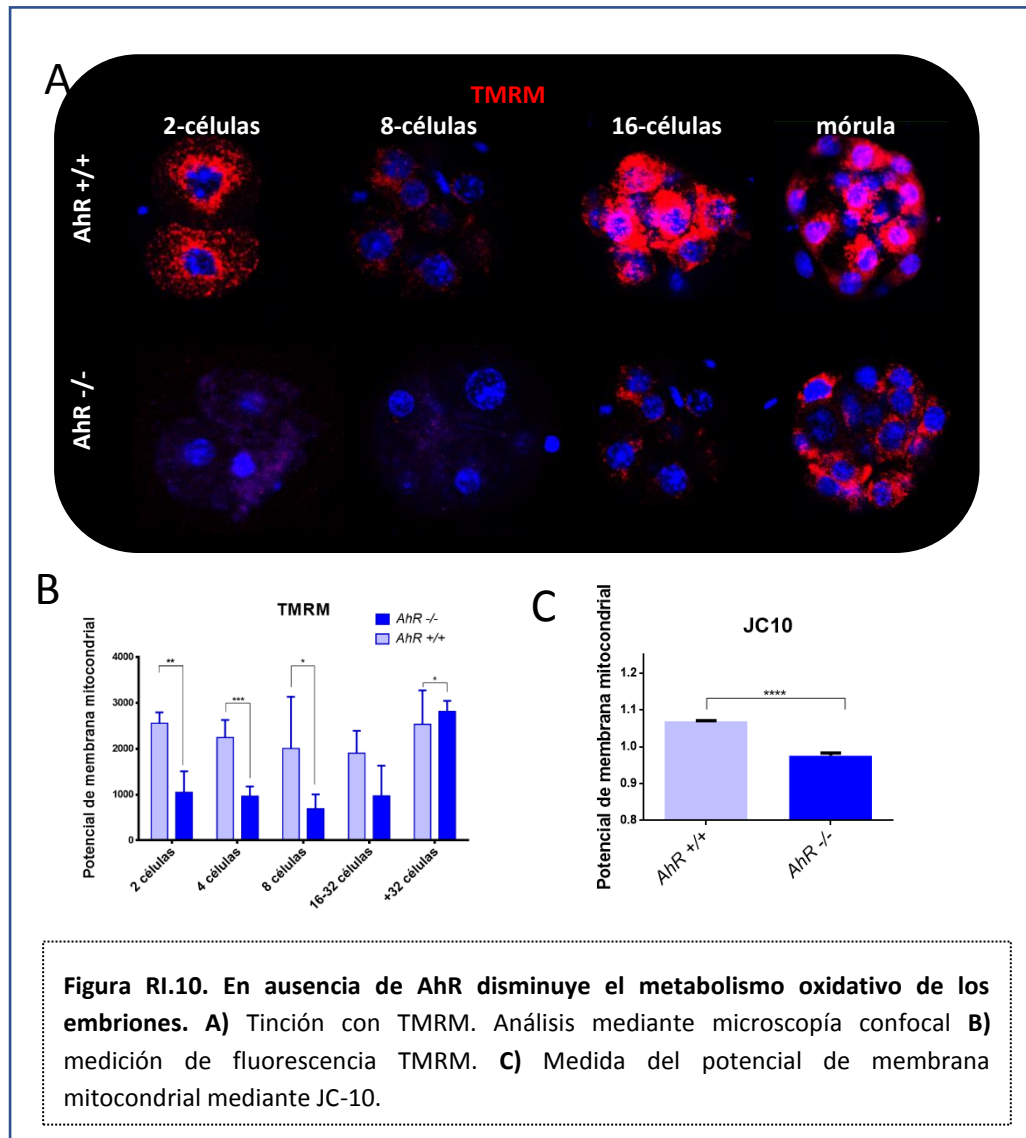
## 6. Los embriones carentes de AhR muestran una actividad metabólica preferentemente glucolítica, manteniendo una menor tasa de metabolismo oxidativo

El estado metabólico de las células se encuentra fuertemente vinculado a su estado de pluripotencia. Durante el proceso de diferenciación, las vías metabólicas son moduladas y se producen cambios en el balance entre metabolismo glucolítico y oxidativo

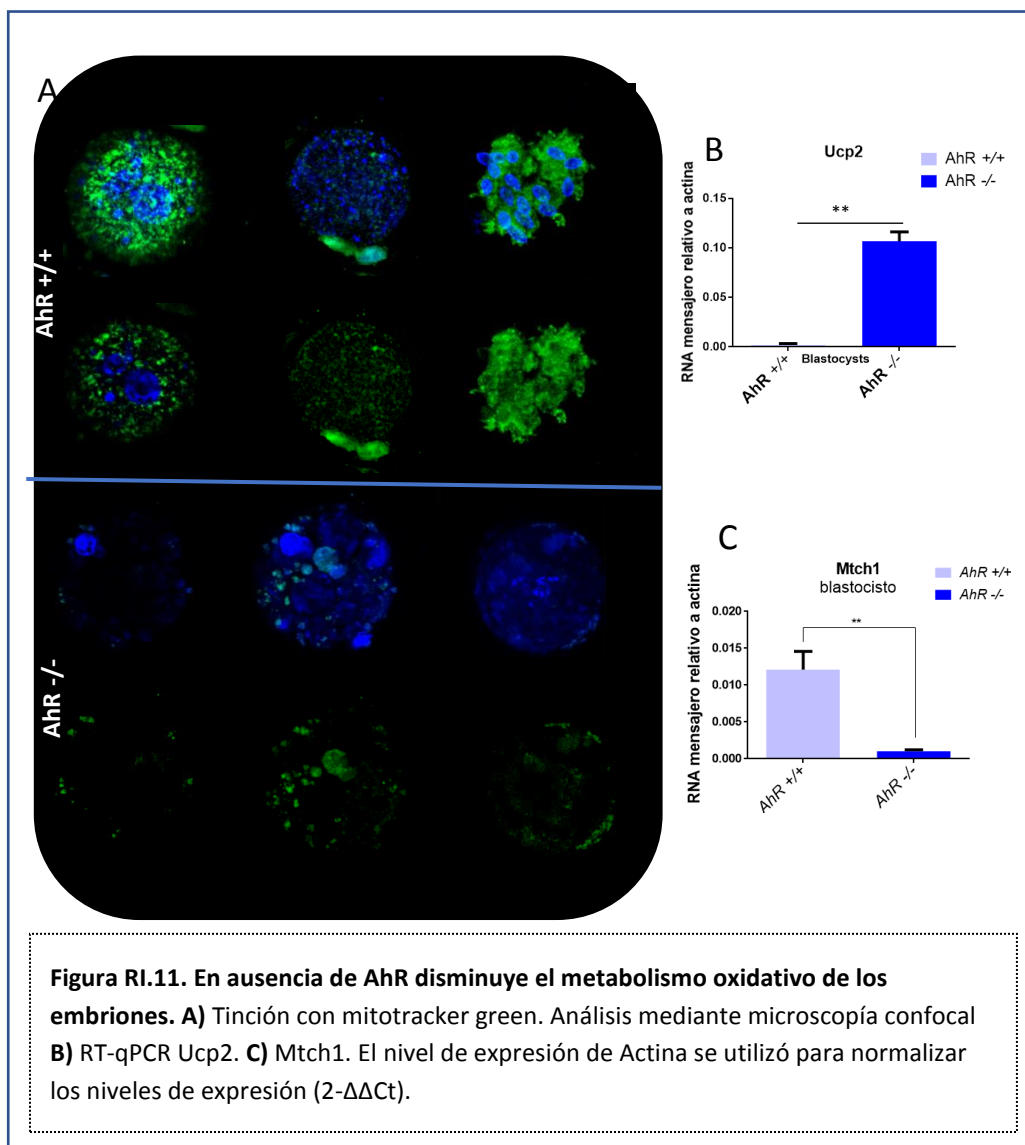
(Shyh-Chang, Daley, & Cantley, 2013). Durante el desarrollo embrionario, las ESCs de la ICM mantienen un potencial de membrana mitocondrial menor (Van Blerkom, 2009), produciéndose un aumento de la glicolisis de manera previa a la expresión de marcadores de pluripotencia (Shyh-Chang et al., 2013). Las ESCs, así como las células madre pluripotentes inducidas (*induced-Pluripotent Stem Cells*, iPSCs), tienen una elevada dependencia de la glicolisis bajo condiciones aerobias, si se comparan con tipos celulares diferenciados que presentan mayores tasas de respiración oxidativa (Folmes et al., 2011; J. Zhang, Nuebel, Daley, Koehler, & Teitell, 2012). Interesantemente, la glucólisis aerobia es una característica que comparten las células pluripotentes y las células tumorales (Ward & Thompson, 2012).

Con la intención de corroborar si los cambios observados a nivel de marcadores de diferenciación se traducen en diferencias metabólicas durante la maduración embrionaria, nos planteamos analizar la actividad mitocondrial en embriones de ambos genotipos. En primer lugar, llevamos a cabo un análisis del potencial de membrana mitocondrial mediante tinción con TMRM (tetrametilrodamina metil ester), una sonda fluorescente que se acumula en las mitocondrias con carga negativa en su membrana. Los resultados obtenidos por microscopía confocal (Figura RI.10) indicaron que en ausencia de AhR, la actividad mitocondrial de los embriones se vio reducida hasta estadios posterior a mórula (Figura RI.10A, B). Con el fin de afianzar este resultado, repetimos los mismos experimentos utilizando el kit comercial JC10, que también permite cuantificar el potencial de membrana mitocondrial. Para ello, analizamos grupos de 30 embriones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> de entre 2,5 y 3,5 dpc por fluorimetría (Figura RI.10C). Los resultados obtenidos revelaron que el potencial de membrana mitocondrial de los embriones *AhR*<sup>+/+</sup> fue significativamente mayor que el de los *AhR*<sup>-/-</sup>. Además, pudimos determinar un menor volumen mitocondrial en los embriones *AhR*<sup>-/-</sup> que en los *AhR*<sup>+/+</sup> tras tinción con mitotracker Green (Figura RI.11A).



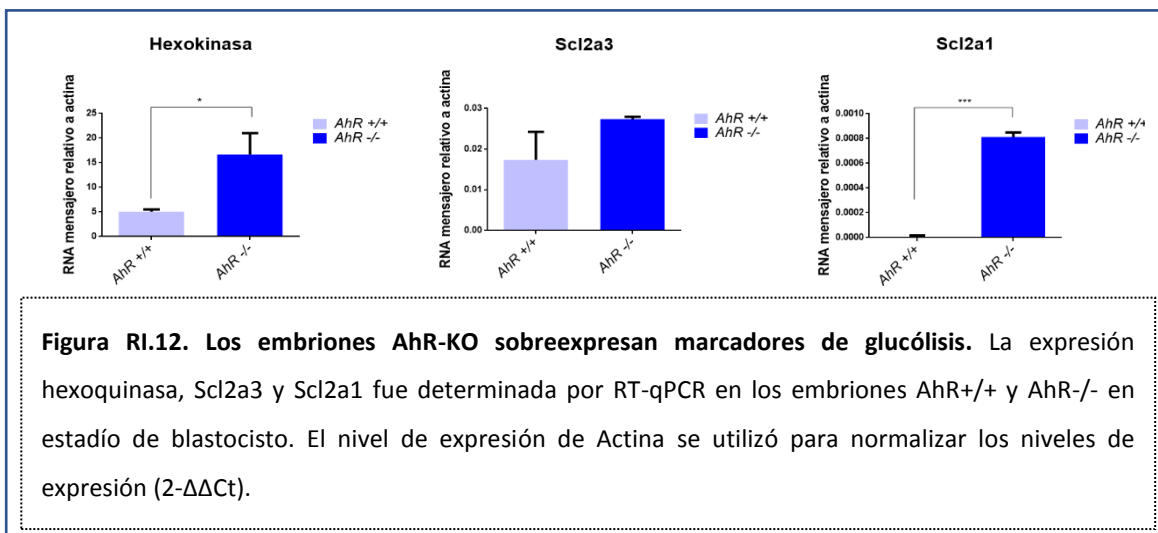


El análisis por RT-qPCR de la proteína de membrana mitocondrial *Mtch1* mostró niveles superiores de expresión en los embriones *AhR*<sup>+/+</sup> que en los *AhR*<sup>-/-</sup> a 2,5 dpc (Figura RI.11C), confirmando así un mayor volumen mitocondrial en presencia del receptor. Por otro lado, el análisis de *Ucp2* (**Un**Coupling **Pro**tein 2), encargada de limitar la entrada de piruvato a la mitocondria, reveló niveles significativamente mayores en blastocistos *AhR*<sup>-/-</sup>, concordantemente con una menor actividad mitocondrial en ausencia de receptor (Figura RI.11B).



Estos resultados indican que AhR favorece un metabolismo preferentemente oxidativo en los embriones, y que en su ausencia la actividad mitocondrial se ve significativamente reducida.

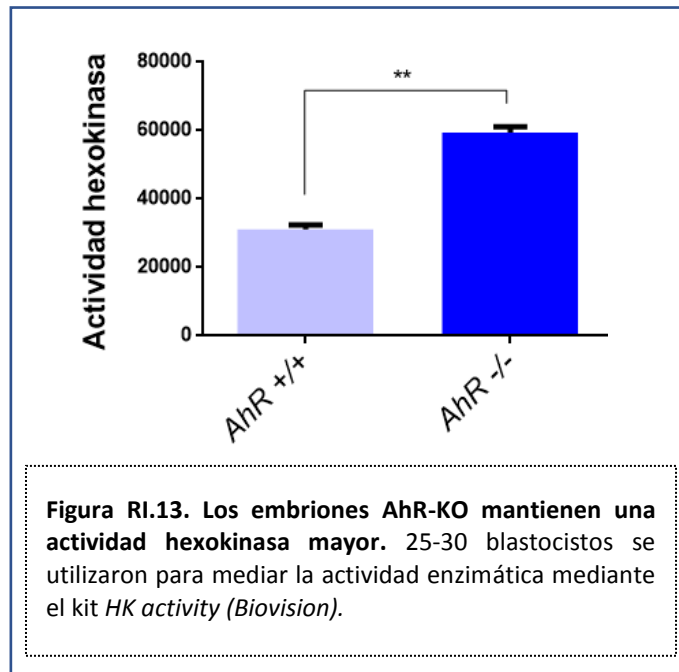
A continuación, decidimos estudiar si existían también diferencias en los niveles glucolíticos durante la embriogénesis en función de la presencia de AhR. En primer lugar, mediante RT-qPCR, determinamos que los niveles de expresión del mRNA de la enzima



Hexoquinasa y de los transportadores de glucosa *Slc2a1* y *Slc2a3* fueron marcadamente superiores en embriones carentes de AhR (Figura RI.12).

Para analizar el metabolismo de la glucosa en los embriones, medimos la actividad Hexoquinasa mediante un ensayo en el que esta enzima convierte la glucosa en glucosa-6-fosfato, la cual a su vez sufre una serie de reacciones que reducen una sonda para generar un producto fluorescente. Para llevar a cabo este ensayo, utilizamos grupos de embriones de ambos genotipos a estadios de desarrollo entre 2,5 y 3,5 dpc. Los resultados, representados en la Figura RI.13, muestran que la ausencia de AhR en embriones generó un aumento significativo en glucólisis.

Las ESCs utilizan de forma específica el aminoácido treonina para mantener su estado de pluripotencia. Frente a otros aminoácidos, esta dependencia de las ESCs del catabolismo de la treonina hace que la enzima Treonina Deshidrogenasa (*Tdh*) se vea fuertemente sobreexpresada en blastocistos y en ESCs con respecto a células diferenciadas (J. Wang et al., 2009). Con la intención de profundizar en el papel de AhR en diferenciación embrionaria a nivel metabólico, llevamos a cabo un análisis de la expresión de esta enzima en embriones a distintos estadios (Figura RI.14). Los niveles de mRNA de *Tdh*, desde el estadio de 2 células hasta el de blastocisto, fueron significativamente mayores en ausencia de AhR que en embriones que expresaban el receptor.



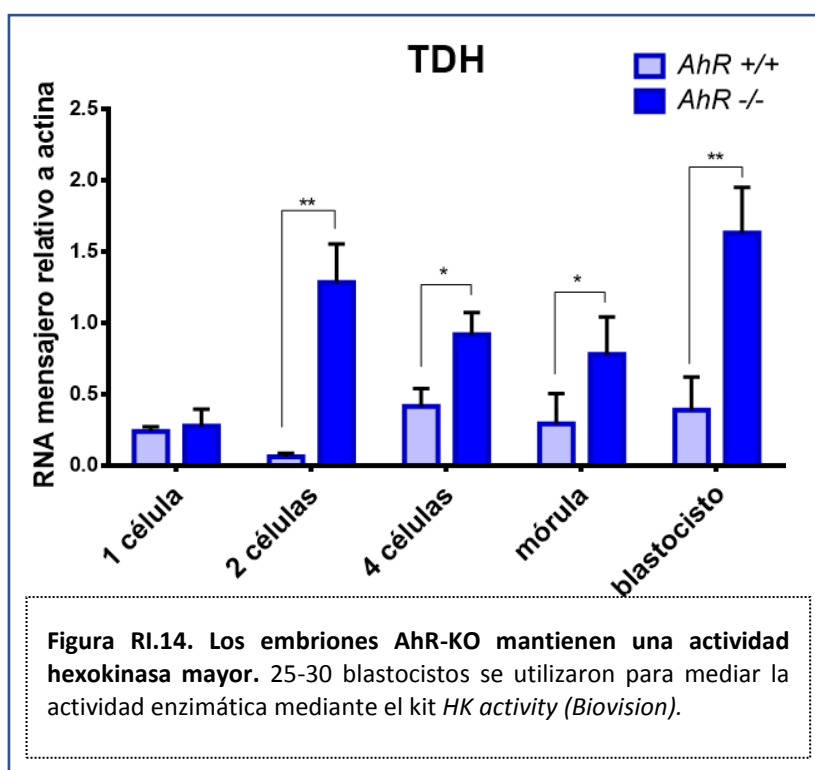
## 7. Los blastocistos *AhR*<sup>-/-</sup> presentaron menor grado de diferenciación

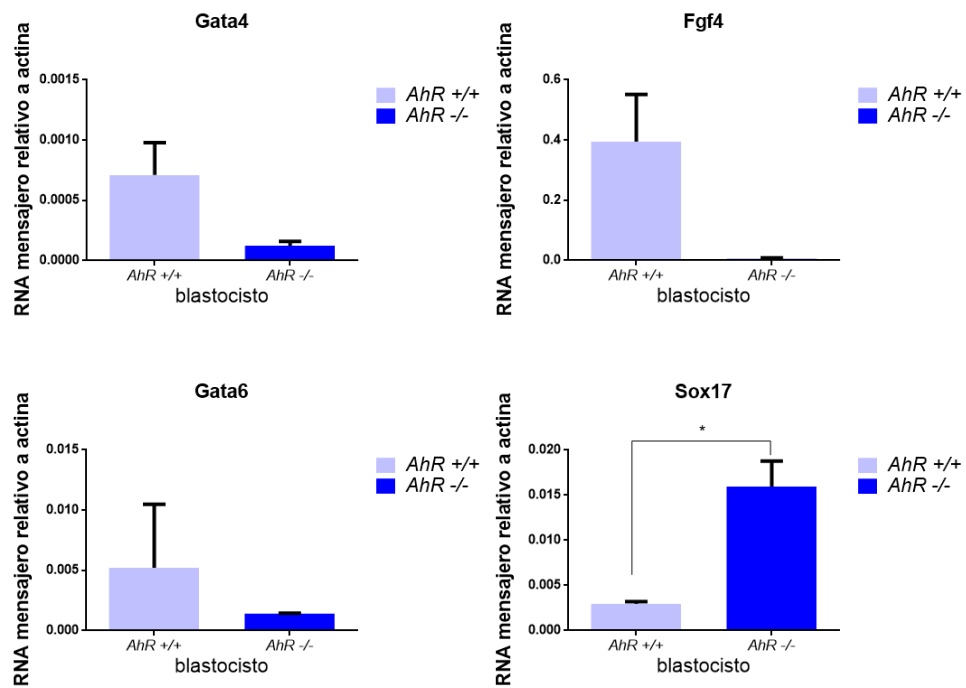
En el blastocisto, una vez completada la diferenciación entre trofotodermo y masa celular interna, sucede una segunda ronda de diferenciación que dará lugar al epiblasto y al endodermo primitivo, el cual constituirá el futuro saco embrionario.

Con el fin de investigar la implicación de AhR en esta segunda ronda de diferenciación embrionaria, analizamos la expresión de marcadores de endodermo primitivo y de epiblasto en blastocistos de ambos genotipos (Figura RI.15). Los resultados obtenidos por RT-qPCR mostraron que los embriones *AhR*<sup>+/+</sup> en estadio de blastocisto expresaban los marcadores de tejido extraembrionario *Gata4* y *Gata6* a niveles significativamente mayores que los de los blastocistos *AhR*<sup>-/-</sup>. Por otro lado, el marcador de endodermo primitivo *Sox17*, apareció significativamente sobreexpresado en embriones *AhR*<sup>-/-</sup>. El factor *Fgf4* es producido por la ICM para dirigir la diferenciación de los dos tipos celulares en la segunda ronda de maduración embrionaria, promoviendo la especificación de los blastómeros que constituirán el endodermo primitivo. Los niveles de mRNA de *Fgf4*

fueron significativamente menores en los blastocistos *AhR*<sup>-/-</sup> con respecto a los blastocistos *AhR*<sup>+/+</sup> (Figura RI.15).

Estos resultados sugieren que AhR favorece la diferenciación de los distintos tipos celulares que constituyen el blastocisto maduro, y que su depleción podría comprometer el correcto establecimiento de la segunda ronda de diferenciación embrionaria.





**Figura RI.15. AhR regula la diferenciación de la masa celular interna en el blastocisto.** RT-qPCR. A) B) C) D) expresión de Gata4 en blastocisto *AhR*+/+ y *AhR*-/. El nivel de expresión de Actina se utilizó para normalizar los niveles de expresión ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

# DISCUSIÓN I

El papel de AhR en diferenciación celular ha sido estudiado intensamente durante las últimas décadas. En trabajos previos de nuestro grupo, hemos demostrado que AhR promueve diferenciación de células de teratoma embrioide humano a través de la inhibición de la expresión de los genes de pluripotencia Oct4 y Nanog. El mecanismo molecular implica la participación de elementos retrotransponibles *Alu* localizados en los promotores de dichos genes. Además, hemos demostrado que la ausencia de receptor en ratones, origina un fenotipo indiferenciado en numerosos tejidos debido a la sobreexpresión de genes de pluripotencia y a la acumulación de subpoblaciones de células madre, lo que origina una ventaja regenerativa (Morales-Hernandez et al., 2016; Morales-Hernandez et al., 2017; Moreno-Marin et al., 2017). Sin embargo, hasta el momento, el papel de AhR en la diferenciación de células madre embrionarias (ESCs) es en gran medida desconocido. Tampoco se ha abordado la posibilidad de que AhR esté implicado en los procesos de diferenciación celular que tienen lugar en estadios tempranos de la embriogénesis.

La comprensión de la regulación del fenotipo *stem* y de la diferenciación de las células madre embrionarias, resulta de especial importancia en biología del desarrollo y en biomedicina. Las ESCs y las células madre tumorales comparten numerosas propiedades, entre ellas: una rápida proliferación, similares requerimientos metabólicos y la inhibición de los mecanismos de diferenciación. Los teratocarcinomas se componen de células con idénticas características a las que presentan las células del embrión en las primeras etapas del desarrollo. Dichas células transformadas son capaces de dar lugar a cualquiera de las tres capas germinales o a tejido extraembrionario, pudiendo incluso desarrollarse normalmente cuando son inyectadas en el blastocisto (Jacob, 1977; Rossant & Papaioannou, 1985). Se ha demostrado que las ESCs tienen un potencial tumorigénico inherente pudiendo generar tumores benignos y teratomas cuando son inyectadas en ratones inmunodeficientes (Solter, 2006). Las ESCs expresan marcadores típicos que



incluyen el oncogén c-Myc (Ben-Porath et al., 2008; Wong et al., 2008) y factores de pluripotencia como son Sox2, Dnmt1, Cbx3 y HDAC1 (Wong et al., 2008). Estos hallazgos vinculan fuertemente el cáncer con la biología de las células madre, donde la capacidad *stemness* es un factor común.

En este capítulo nos propusimos investigar el papel de AhR en la diferenciación de ESCs *in vivo* durante el desarrollo embrionario preimplantacional de ratón. En esta fase de la embriogénesis, los blastómeros totipotentes generan los tres primeros linajes celulares del embrión: trofotodermo, epiblasto y endodermo primitivo. La embriogénesis de ratón ha sido ampliamente estudiada con el fin de conocer los procesos que dirigen el desarrollo en mamíferos. Adicionalmente, constituye un excelente modelo para investigar la plasticidad de las células madre. Estudiar cómo diversos intermediarios moleculares gobiernan el equilibrio entre pluripotencia y diferenciación en blastocistos, nos ayuda a comprender el comportamiento de las células madre en otras condiciones fisiológicas y patológicas. Un hallazgo importante de este estudio es que AhR afecta a los procesos de diferenciación que sufren las células totipotentes durante la formación del blastocisto, posiblemente a varios niveles.

El cigoto que se origina tras la fecundación proviene de dos células terminalmente diferenciadas. A medida que se van sucediendo las divisiones celulares durante la fase de *cleavage*, los factores que constituyen la red central de pluripotencia aumentan su expresión, generándose células totipotentes capaces de dar lugar a un organismo completo. En el primer capítulo de esta Tesis Doctoral, hemos demostrado que AhR está involucrado en el control de la expresión de factores relevantes en pluripotencia durante las primeras etapas de la embriogénesis. Sorprendentemente, los cigotos procedentes de ratones que no expresan el receptor de aril hidrocarburos tienen sobreexpresión basal de los genes de pluripotencia Oct4 y Nanog, similarmente a lo que ocurre en varios tipos de células indiferenciadas procedentes de ratones *AhR*<sup>-/-</sup> (Morales-Hernandez et al., 2017; Moreno-Marin et al., 2017)

Durante la gametogénesis, se generan marcas epigenéticas que contribuirán a la generación de células germinales terminalmente diferenciadas, las cuales, tras la fecundación, sufrirán una reprogramación epigenética global para el establecimiento de un estado totipotente en el embrión (Fraser & Lin, 2016). En trabajos previos de nuestro laboratorio, se ha constatado que AhR regula positivamente el desarrollo folicular ovárico a través de piRNAs, retrotransposones y proteínas asociadas a piRNAs (Rico-Leo et al., 2016). Estos resultados apoyan el hecho de que un cigoto temprano procedente de la unión de gametos *AhR*<sup>-/-</sup> presente alteraciones basales en su estado pluripotente. De este modo, los gametos carentes del receptor poseen un mayor grado de inmadurez que puede dar lugar a diferencias en su estado pluripotente en las etapas iniciales de desarrollo. AhR también podría actuar reprimiendo genes de pluripotencia en las etapas iniciales de desarrollo a través del control de la expresión de los transcritos procedentes de elementos retrotransponibles B1-SINE, como ya demostramos que ocurre en células de carcinoma embrioide humano (Morales-Hernández, González-Rico et al. 2016). En embriones murinos, hemos podido comprobar que los transcritos no codificantes (ncRNAs) de los elementos B1-SINE aumentan a medida que progresa el desarrollo embrionario de una manera dependiente de AhR. Serían necesarios experimentos futuros para determinar el papel de estos elementos móviles en la diferenciación embrionaria regulada por AhR. Se han llevado a cabo estudios que demuestran que los RNAs no codificantes procedentes de los elementos transponibles B1-SINE tienen un papel activo en el desarrollo embrionario (Ohnishi et al., 2012). Dicho estudio muestra que dichos RNAs pequeños se expresan ya en el cigoto y que son fundamentales en el desarrollo preimplantacional, sugiriendo además, que son procesados por Dicer y están implicados en el silenciamiento génico durante el desarrollo. Este mecanismo resulta ser el mismo por el que el AhR media la inhibición de los factores de pluripotencia en células humanas, por lo que resulta más que probable que esté actuando durante la diferenciación de las células madre embrionarias en los primeros estadios de desarrollo en ratones *AhR*<sup>-/-</sup>.

Los genes de pluripotencia deben alcanzar niveles suficientes de expresión para activar la red que mantiene indiferenciadas a las ESCs, tal y como sucede a lo largo del desarrollo de embriones *AhR*<sup>+/+</sup>. Oct4, Sox2 y Nanog aumentaron su expresión progresivamente durante la formación de blastocistos en ratones silvestres. Esto también tuvo lugar en ausencia de AhR, si bien dichos genes presentaron niveles basales de expresión significativamente más elevados. Esto podría deberse a la pérdida de la represión que ejerce AhR sobre estos genes de pluripotencia, tal vez mediada por ncRNAs procedentes de elementos B1-SINE.

El papel pro-diferenciación de AhR en la embriogénesis también está respaldado por la propia regulación de la expresión del receptor. Hemos observado que los niveles de AhR aumentaron a medida que avanzó la diferenciación, y que su localización cambió en función de las decisiones de destino y de la reducción en los niveles de pluripotencia. Hemos demostrado cómo la expresión de AhR está en gran medida restringida a los blastómeros que se diferencian al linaje de trofotodermo. En ausencia del receptor, la expresión de los marcadores propios de ICM (Oct4) y de trofotodermo (Cdx2) no se delimitaron correctamente en los blastómeros externos/internos, indicando que AhR ejerce una regulación importante en la restricción de la pluripotencia necesaria para establecer las decisiones de destino en la embriogénesis. En este trabajo, hemos observado que el maestro regulador que controla la red de pluripotencia, Oct4/PouF5, mostró un patrón de expresión contrario al de AhR, lo que indica un posible mecanismo de regulación negativa por parte del receptor. La eliminación de Oct4 permite la activación de programas de diferenciación en aquellos blastómeros que restringen su destino celular, como ocurre en la formación del tejido extraembrionario. El vínculo entre Oct4 y AhR se ha sugerido previamente en estudios con células madre, sugiriéndose la posibilidad de supresión recíproca entre AhR y Oct4 (Cheng et al., 2015; Jiasheng Song et al., 2002). Nosotros proponemos que este mecanismo de regulación negativa estaría actuando en el control del proceso de diferenciación de ESCs durante el desarrollo embrionario preimplantacional. Estos mismos mecanismos podrían actuar regulando la

pluripotencia en muchos otros procesos regidos por la plasticidad celular. Oct4 es un regulador fundamental de *stemness*, crucial en todos los procesos relacionados con la diferenciación celular y la pluripotencia, encontrándose sobreexpresado en numerosos tumores humanos y líneas celulares inmortalizadas. En ratón, se ha comprobado que los altos niveles de expresión de Oct4 aumentan la malignidad de los tumores derivados de ESCs; coherentemente, la reducción de Oct4 en células de cáncer de pulmón bloquea su clonogenicidad y la invasión tumoral (Liu et al., 2011). Se ha propuesto que Oct4 promueve la formación de tumores in vivo e inhibe la apoptosis mediante la activación de la expresión del micro RNA miR-125b (Y.-D. Wang et al., 2013).

En la fase de mórula, la primera división asimétrica es determinante para la diferenciación embrionaria. Una vez se ha constituido el blastocisto, sucede una segunda ronda de diferenciación que da lugar a dos tipos de células en la ICM. El hecho de que AhR se module durante estos procesos de diferenciación, unido a los resultados que lo vinculan con la ruta Hippo, nos hizo pensar que probablemente AhR participe en diferenciación embrionaria más allá de la regulación negativa de los genes de pluripotencia al principio del *cleavage*.

En células de neuroblastoma, AhR y YAP colocalizan, modulando su ubicación de acuerdo con la densidad celular. También hemos observado que los niveles nucleares de YAP están modulados por la presencia de AhR, y que se correlacionan positivamente con un estado más diferenciado de las células NTERA-2 (Morales-Hernández, resultados no publicados). En este trabajo, hemos mostrado que la determinación del destino de las células de trofectodermo, en cuyo proceso tiene un papel relevante la translocación nuclear YAP, puede estar sujeta a regulación por AhR. De la misma manera que sucede en células humanas NTERA-2, AhR y YAP se encuentran en el núcleo de los blastómeros externos, donde se activa la diferenciación hacia linaje de trofectodermo. La ausencia de AhR en los embriones parece originar una pérdida de transmisión de la polaridad que se establece en la división asimétrica a través de la ruta Hippo. Esta posibilidad se encuentra

apoyada por la expresión de Oct4 en blastómeros externos de blastocistos *AhR*<sup>-/-</sup>, así como por la reducción de los niveles nucleares de YAP.

Una característica de las células madre embrionarias es que presentan bajos niveles de fosforilación oxidativa. La síntesis de ATP depende principalmente de la glucólisis, siendo esta una propiedad común de las células indiferenciadas. El aumento de la glucólisis precede a la reactivación de los marcadores de pluripotencia (Shyh-Chang et al., 2013). En este trabajo, hemos observado como durante la embriogénesis, las diferencias que observamos en los marcadores de diferenciación en ausencia de AhR, estaban correlacionadas con el estado metabólico. Hemos demostrado que la falta de AhR origina una disminución de la actividad mitocondrial, manteniendo un metabolismo preferentemente glucolítico aerobio. Durante la diferenciación embrionaria, las vías metabólicas se modulan de acuerdo con las necesidades del embrión. Por tanto, sería interesante llevar a cabo futuros análisis para definir en qué punto del cambio metabólico estaría actuando AhR. Hemos determinado de manera preliminar que los embriones *AhR*<sup>-/-</sup> sobreexpresan la enzima treonina deshidrogenasa (TDH), responsable de proporcionar metabolitos generados por la degradación de treonina los cuales son utilizados de forma específica por las células madre. Estos datos apoyan que la ausencia de AhR origina un estado metabólico en los embriones correspondiente con un grado menor de diferenciación.

Previamente, se ha observado que los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> tienen una fertilidad reducida, generándose un menor número de crías nacidas vivas en comparación con los animales que expresan AhR. De hecho, dicho fenotipo parece deberse, al menos en parte, a un aumento en la resorción de embriones y a una menor capacidad para completar el programa de preimplantación tras la etapa de blastocisto (Barbara D. Abbott et al., 1999); (Jeffrey M Peters & Wiley, 1995). Aquí, hemos estudiado cómo AhR afecta las primeras etapas del desarrollo preimplantacional en un intento por comprender las funciones del receptor en la pluripotencia y en la diferenciación de células madre. Hemos demostrado que AhR tiene funciones pro-diferenciación en la embriogénesis de ratón y que es

necesario para especificar los diferentes linajes celulares que componen el blastocisto. Nuestros resultados sugieren que AhR tiene una implicación relevante en la diferenciación de células madre embrionarias, y que su deficiencia podría afectar negativamente a la progresión del desarrollo embrionario preimplantacional, lo que finalmente compromete la viabilidad a nivel prenatal.

# CONCLUSIONES I

### **AhR promueve la diferenciación durante la embriogénesis temprana de ratón.**

- El receptor AhR sufre una regulación positiva durante la diferenciación embrionaria temprana.
- AhR inhibe la expresión de genes de pluripotencia durante las primeras etapas del desarrollo embrionario.
- AhR participa en la regulación de la localización de los principales factores de la red de pluripotencia en el embrión, mostrando un patrón opuesto al de Oct4 a lo largo del desarrollo.
- La depleción de AhR origina una sobreactivación de la ruta Hippo que probablemente dificulta que la primera decisión de destino se produzca correctamente.
- El establecimiento de los diferentes linajes celulares en el blastocisto se ve comprometido en ausencia de AhR.





## CAPÍTULO II



# INTRODUCCIÓN II

### 1. Ras GTPasas

Las proteínas Ras (*Rat Sarcoma*) son importantes miembros de la superfamilia de GTPasas pequeñas. Descubiertas a finales de los '80, fueron las primeras proteínas en formar parte de este grupo de GTPasas, el cual se encuentra conservado desde levaduras a *C. elegans*, *Drosophila* y mamíferos. Las proteínas Ras regulan una amplia variedad de procesos celulares, incluida la diferenciación, proliferación, dinámica y transporte de vesículas y orgánulos, dinámica nuclear y regulación del citoesqueleto (Reiner & Lundquist, 2016). Estas GTPasas actúan como interruptores moleculares encargados de transducir señales de varios receptores, tales como los tirosina quinasa, receptores acoplados a proteínas G y receptores de citoquinas, todos ellos moduladores de múltiples vías de señalización que regulan importantes repuestas en la célula (Rojas, Oliva, & Santos, 2011; Vigil, Cherfils, Rossman, & Der, 2010). La familia de las GTPasas Ras comprende tres genes en humanos HRAS, NRAS y KRAS (HRas, NRas y KRas en ratones), que codifican para cuatro proteínas: HRAS, NRAS, KRAS4A y KRAS4B; las dos últimas isoformas de KRAS derivadas de corte y empalme alternativo. Las proteínas Ras se encuentran principalmente en el lado citosólico de la membrana plasmática, pero también pueden ubicarse en otras membranas como las membranas de Golgi (HRas y NRas) y de retículo endoplasmático (HRas y KRas) gracias a restos lipídicos específicos añadidos a su extremo carboxilo (Li, Balmain, & Counter, 2018).

El mecanismo de acción de estas proteínas para la transducción de señales se basa en la alternancia entre un estado activo, unido a GTP, y otro inactivo en el que se encuentran unidas a GDP. Este mecanismo de intercambio GDP/GTP está altamente conservado en la escala evolutiva y permite una rápida capacidad de respuesta actuando como un interruptor de la transmisión de señales en la célula. La forma activa de Ras,

unida a GTP, es estimulada por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (**GTP Exchange Factor**, GEF). El intercambio de GDP por GTP hace que Ras adopte una nueva conformación que permite su unión a una serie de proteínas efectoras a través de su dominio de unión a Ras (**Ras Binding Domain**, RBD). Entre sus efectores mejor estudiados se encuentran las Raf quinasas de la ruta MAPK (**Mitogen-Activated Protein Kinases**), la subunidad p110 de PI3K (**Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase**, PI3K) y los GEFs RAL, que transmiten una variada serie (McCubrey et al., 2007; McKay & Morrison, 2007). La conversión a la forma inactiva está mediada por proteínas activadoras de la actividad GTPasa (**GTPase Activating Protein**, (Cherfils & Zeghouf, 2013). Estas proteínas aceleran la actividad GTPasa de Ras, devolviéndolo al estado inactivo unido a GDP y apagando la señalización. Ras comunica señales extracelulares procedentes de receptores al núcleo, y por tanto, su desregulación conduce a actividades celulares inapropiadas, incluyendo alteraciones en el crecimiento celular, la proliferación, diferenciación, (McCubrey et al., 2007; McKay & Morrison, 2007).

## 2. K-Ras y la vía de señalización de las MAPK

La vía de señalización RAF-MEK-ERK (**Mitogen-activated protein kinase kinase**)-(**Extracellular signal-Regulated Kinase**) actúa como un mediador principal de la oncogénesis inducida por Ras. Típicamente, un ligando se une al receptor tirosina quinasa induciendo su dimerización y autofosforilación. Esto genera sitios de unión para otras proteínas, como por ejemplo GRB2 (**Growth factor Receptor-Bound protein 2**), que recluta GEFs a la membrana plasmática y activa el intercambio GDP/GTP en Ras. Cuando Ras está en su conformación activa unida a GTP, recluta a Raf quinasas (ARaf, BRaf y CRaf) a la membrana plasmática, uniéndose a ellas (Chong, Vikis, & Guan, 2003; Wellbrock, Karasarides, & Marais, 2004). Una vez que el complejo Ras-Raf se ha establecido en la membrana, Ras activa la función serina/treonina quinasa de Raf. Tras su activación Raf

actúa como MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK) para activar MEK1 y MEK2, que, a su vez, catalizan la activación de los efectores ERK1 y ERK2 y su translocación en el núcleo, dónde fosforilan a varios efectores nucleares y citoplasmáticos involucrados en diversas respuestas celulares (Mebratu & Tesfaigzi, 2009; Meloche & Pouyssegur, 2007).

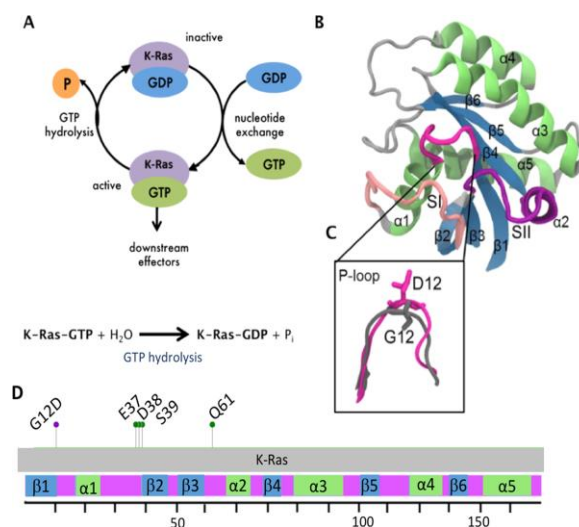
La cascada MAPK consta de una serie de quinasas que se activan secuencialmente para controlar, en última instancia, procesos como la transcripción y la progresión del ciclo celular (Z. Chen, Fillmore, Hammerman, Kim, & Wong, 2014). Datos recientes han demostrado que Ras puede activar otras vías de señalización, incluida la de PI3K y la de proteínas Rac y Rho, asociadas con la regulación del citoesqueleto y la capacidad invasiva de las células tumorales. A través de Ras, pueden también activarse las vías de señalización de p38MAPK, y la de la proteína quinasa activada por estrés c-Jun N-terminal (JNK) (Binétruy, Smeal, & Karin, 1991; Pulverer, Kyriakis, Avruch, Nikolakaki, & Woodgett, 1991; Smeal, Binétruy, Mercola, Birrer, & Karin, 1991).

### **3. Oncogén Kras**

Las proteínas Ras se encuentran mutadas frecuentemente en numerosos tipos de cáncer y en desórdenes del desarrollo denominados Rasopatías (Simanshu, Nissley, & McCormick, 2017). Aproximadamente el 17% de los pacientes de cáncer presentan una mutación que activa RAS a su versión oncogénica mientras que las mutaciones en la vía de señalización del receptor tirosina quinasa (RTK)-RAS se encuentran presentes en aproximadamente el 50% de todos los pacientes con cáncer (Prior, Lewis, & Mattos, 2012; Sanchez-Vega et al., 2018). Un tercio de los cánceres humanos presentan desregulación en la señalización de las GTPasas de la familia RAS debido a una mutación puntual (Hobbs, Der, & Rossman, 2016). La mayoría de estas mutaciones puntuales alteran los aminoácidos G12, G13 o Q61, conduciendo a una pérdida de la actividad GTPasa que supone la activación constitutiva de la proteína causante de su potencial oncogénico

(Schubbert et al., 2006). De las mutaciones puntuales que activan constitutivamente KRas, el residuo G12 es el más mutado, con una frecuencia del 89% del total de mutaciones puntuales que sufre el gen. La glicina en posición 12 muta frecuentemente a aspartato (G12D) (Krupa et al., 2016; Prior et al., 2012).

En este estudio, nos hemos enfocado en la mutación de KRas observada con mayor frecuencia en pacientes con cáncer, KRas G12D (Figura I2.1). La glicina en posición 12 se encuentra en el centro activo de la proteína, que consiste en un bucle de unión a fosfato y de dos regiones de intercambio (*Switch*). Estos residuos del sitio activo se unen a los grupos fosfato del GTP y son los responsables de la función GTPasa de KRas. Las regiones *Switch* son además responsables de regular su unión a las proteínas efectoras y reguladoras. La mutación a aspartato (G12D) origina que en el sitio activo haya un residuo más voluminoso y cargado, lo que causa un impedimento estérico para la hidrólisis del GTP (Malumbres, 2003); este deterioro de la función GTPasa bloquea KRas en su estado activo (unido a GTP) (Scheffzek et al., 1997), provocando una señalización constitutiva. Se ha demostrado que la expresión de esta versión mutada KRasG12D en epitelio de colon causa hiperproliferación de una forma dependiente de MEK (Haigis et al., 2008). En pulmón, la mutación KRas G12D causa la formación de adenomas a través de la actividad de las MAPK quinasas.



**Figura I2.1.** Esquema de la estructura de la proteína K-RasG12D (Vatansever, Erman, & Gümüş, 2019).



#### 4. Adenocarcinoma pulmonar

El pulmón de mamífero adulto está organizado en dos compartimentos principales: las vías respiratorias, que transportan gases, y los alvéolos donde se produce el intercambio de los mismos. Se cree que el pulmón comprende hasta 40 tipos de células diferentes (Franks et al., 2008). El epitelio pulmonar proviene del endodermo, mientras que el mesénquima que forma parte del pulmón es de origen mesodérmico. El epitelio de las vías aéreas actúa como una barrera luminal de los conductos que transportan los gases hacia los alvéolos. Entre las funciones de este epitelio, se incluye la secreción, regeneración, detención de infecciones, procesamiento de toxinas y la eliminación de desechos. Las células secretoras producen mucinas y péptidos antimicrobianos y metabolizan toxinas, mientras que las células ciliadas están implicadas en el transporte de los desechos del pulmón (Jeffery & Li, 1997).

Las regiones más proximales del epitelio de la vía aérea murina poseen células basales que actúan como células progenitoras para reponer tanto las células secretoras como las células ciliadas. Se cree que las células neuroendocrinas están involucradas en las actividades de detección y que se comunican con los sistemas inmune y nervioso. El epitelio alveolar, por otro lado, consiste en células alveolares tipo 1 (ATI) encargadas del intercambio de gases, y células alveolares tipo 2 (ATII) que producen tensioactivos surfactantes como la proteína Sftpc (SPC) necesarios para prevenir el colapso alveolar (Michael J Evans, Cabral, Stephens, & Freeman, 1975). Además de estas funciones, se ha comprobado que las células ATII son capaces de dar lugar a las ATI, contribuyendo de este modo a la recuperación de lesiones pulmonares. Las células ATII tienen, además, capacidad de expandirse clonalmente, por lo que se han clasificado como células madre / progenitoras de los alvéolos pulmonares adultos (Barkauskas et al., 2013). La zona de transición desde los bronquiolos a la región alveolar se conoce como la unión del conducto bronquioalveolar (BADJ). En el ratón, las células epiteliales localizadas en esta región coexpresan marcadores tanto de células secretoras (SCGB1A1+) como de células

alveolares tipo 2 (Sftpc+), habiéndose denominado células madre bronquioalveolares (BASC) (C. F. B. Kim et al., 2005)

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte relacionada con cáncer en todo el mundo, representando 1.8 millones de fallecimientos por año (Torre et al., 2015). Por lo general, los cánceres de pulmón pueden dividirse en dos tipos según criterios histológicos: carcinoma de pulmón de células pequeñas (*Small-Cell Lung Cancer*, SCLC) que representa el 15% de todos los cánceres de pulmón, y carcinoma de células no pequeñas (*Non-Small-Cell Lung Cancer*, NSCLC) que representa el 85% de los casos. A su vez, el NSCLC es una enfermedad bastante heterogénea que puede subdividirse en clases distintas: los adenocarcinomas (50% de los casos) y los carcinomas de células escamosas (40% de los casos). Otros subtipos de carcinomas de células grandes son menos frecuentes (Herbst & Heymach, 2008). El adenocarcinoma pulmonar es el tipo de cáncer de pulmón más común, siendo KRAS el protooncogén más frecuentemente mutado en este tipo de tumores. Durante la última década, la caracterización molecular de los adenocarcinomas pulmonares ha revelado una serie de alteraciones genéticas recurrentes que actúan como impulsores oncogénicos. El 25% de los casos se deben a una mutación en KAS, frente a otras mutaciones presentes en genes que codifican para EGFR, ALK o HER2 o frente a la inactivación de supresores tumorales (Ostrem, Peters, Sos, Wells, & Shokat, 2013). Además, se ha demostrado que la activación de este oncogén ocurre en las primeras etapas de la tumorigénesis (Guerra et al., 2003; Jackson et al., 2001; L. Johnson et al., 2001)

Las vías de señalización asociadas a KRAS y más directamente implicadas en la transformación neoplásica son la cascada de las MAPK (RAF/ MEK / ERK) así como la vía de PI3K/PDK1/AKT (Pylayeva-Gupta, Grabocka, & Bar-Sagi, 2011). La amplificación de la señalización de las MAPK resultante de la actividad constitutiva de KRas G12D, no solo promueve la progresión de los adenocarcinomas pulmonares, sino que está implicada en el inicio del desarrollo tumoral en poblaciones celulares concretas del pulmón (Cicchini et al., 2017). Se ha demostrado que la expresión somática de KRas oncogénico a partir de su

locus endógeno inicia el desarrollo tumoral en un tipo limitado de células (Guerra et al., 2003; L. Johnson et al., 2001; Mainardi et al., 2014; Sutherland et al., 2014), siendo las ATII las que de forma predominante dan origen al adenocarcinoma (Sutherland et al., 2014; Xu et al., 2012).

En el epitelio pulmonar del ratón adulto, la expresión de KRasG12D induce la transformación neoplásica y el inicio de lesiones adenomatosas que pueden progresar a adenocarcinoma de pulmón de características similares al que aparece en humanos (Guerra et al., 2003; Jackson et al., 2001). Esto hace de los modelos transgénicos, en los que se puede inducir la expresión de estas mismas mutaciones, herramientas de gran utilidad en el estudio de los intermediarios moleculares que afectan al inicio y la progresión de estos tumores, siendo posible la identificación de nuevos marcadores de pronóstico o dianas terapéuticas.

## OBJETIVOS II

## OBJETIVOS II

---

Las mutaciones en la familia de protooncogenes Ras son responsables del 20-30% de los cánceres humanos. Debido a la gran relevancia social de estas patologías, se hace indispensable la caracterización de intermediarios que participen en el desarrollo de tumores causados por la desregulación de estas vías.

El objetivo general de este capítulo fue estudiar el papel de AhR en la iniciación y el desarrollo de adenocarcinoma pulmonar empleando para ello un modelo transgénico de tumorigénesis por activación de la mutación puntual KRasG12D.

Nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

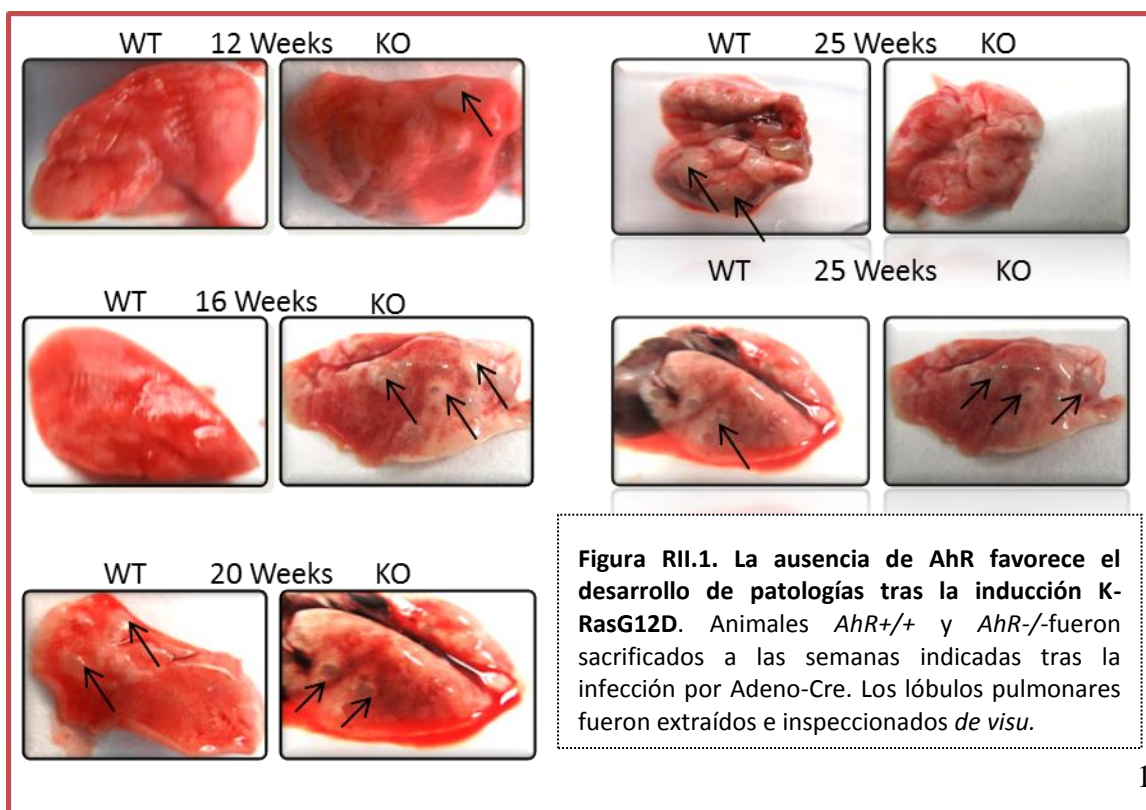
- Analizar la aparición y la progresión de tumores pulmonares en ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> tras la inducción de la expresión de la mutación KRasG12D.
- Estudiar el efecto que causa la presencia de AhR sobre los niveles de expresión de distintos marcadores asociados al proceso de desarrollo de adenocarcinoma pulmonar.
- Determinar el papel de AhR en la capacidad de formación de organoides que presentan las células pulmonares *AhR*<sup>+/+</sup> KRas G12D y *AhR*<sup>-/-</sup> KRas G12D.
- Analizar el transcriptoma de los adenocarcinomas pulmonares desarrollados en animales *AhR*<sup>+/+</sup> KRas G12D y *AhR*<sup>-/-</sup> KRas G12D.

## RESULTADOS II

## RESULTADOS II

### 1. La depleción de AhR aceleró la aparición de patologías proliferativas ocasionadas por la mutación KRas G12D en pulmón

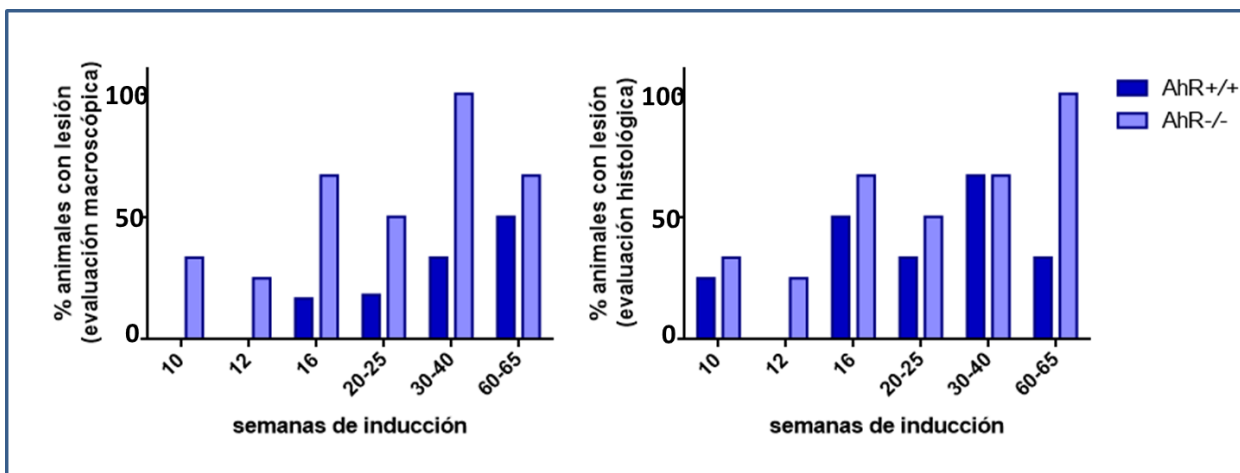
Con la finalidad de detectar la aparición de lesiones tumorales causadas por el oncogén KRas en pulmón, sacrificamos animales  $AhR^{+/+}/KRas^{LSL-G12D/+}$  y  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$  a tiempos tempranos tras la inducción de la expresión del alelo mutante KRasG12D mediante infección intranasal con Adeno-Cre. Una vez extraídos, los sacos pulmonares fueron inspeccionados *de visu* no detectándose irregularidades apreciables ni a 6 ni a 8 semanas en ninguno de los dos genotipos (Figura RII.1). A las 10 semanas, se encontraron pulmones con pequeñas lesiones apreciables macroscópicamente en el 33% de los animales de genotipo  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$  analizados. Transcurridas 12 semanas desde la inducción de la expresión de KRas mutado, encontramos pequeños tumores en un 25%



más de animales  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$  que en  $AhR^{+}/+/KRas^{LSL-G12D/+}$ ; en los animales sacrificados tras 16 semanas desde la inducción, observamos alteraciones en el aspecto de los lóbulos pulmonares en los ratones  $AhR^{+}/+/KRas^{LSL-G12D/+}$  en un 16% de los casos, mientras que este porcentaje subió hasta el 60% en los ratones  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$  (Figura RII.2).

Mediante el procesamiento del tejido pulmonar para su inclusión en bloques de parafina y tinción con hematoxilina/eosina, pudimos realizar una evaluación anatomopatológica de las lesiones que aparecieron una vez activada la expresión del oncogén KRasG12D. Como se observa en la Figura RII.3, la estructura histológica pulmonar se mantuvo conservada en los animales de ambos genotipos hasta la aparición de las primeras lesiones proliferativas del epitelio en ratones  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$  a las 10 semanas tras la inducción de la expresión del oncogén. Tras 12 semanas, aparecieron algunas hiperplasias endobronquiales en ausencia de AhR, y a 16 semanas, pudimos apreciar hiperplasias de neumocitos tipo II y adenomas en ambos genotipos, aunque en ratones  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$  la incidencia de lesiones continuó siendo un 16% mayor que en ratones  $AhR^{+}/+/KRas^{LSL-G12D/+}$ . Además, observamos como las hiperplasias de tipo endobronquial que constituyen lesiones papilares, se dieron con mayor frecuencia en animales  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$ . Los animales evaluados a las 20-25 semanas mostraron aproximadamente la misma proporción en cuanto al desarrollo de lesiones hiperplásicas en ambos genotipos.

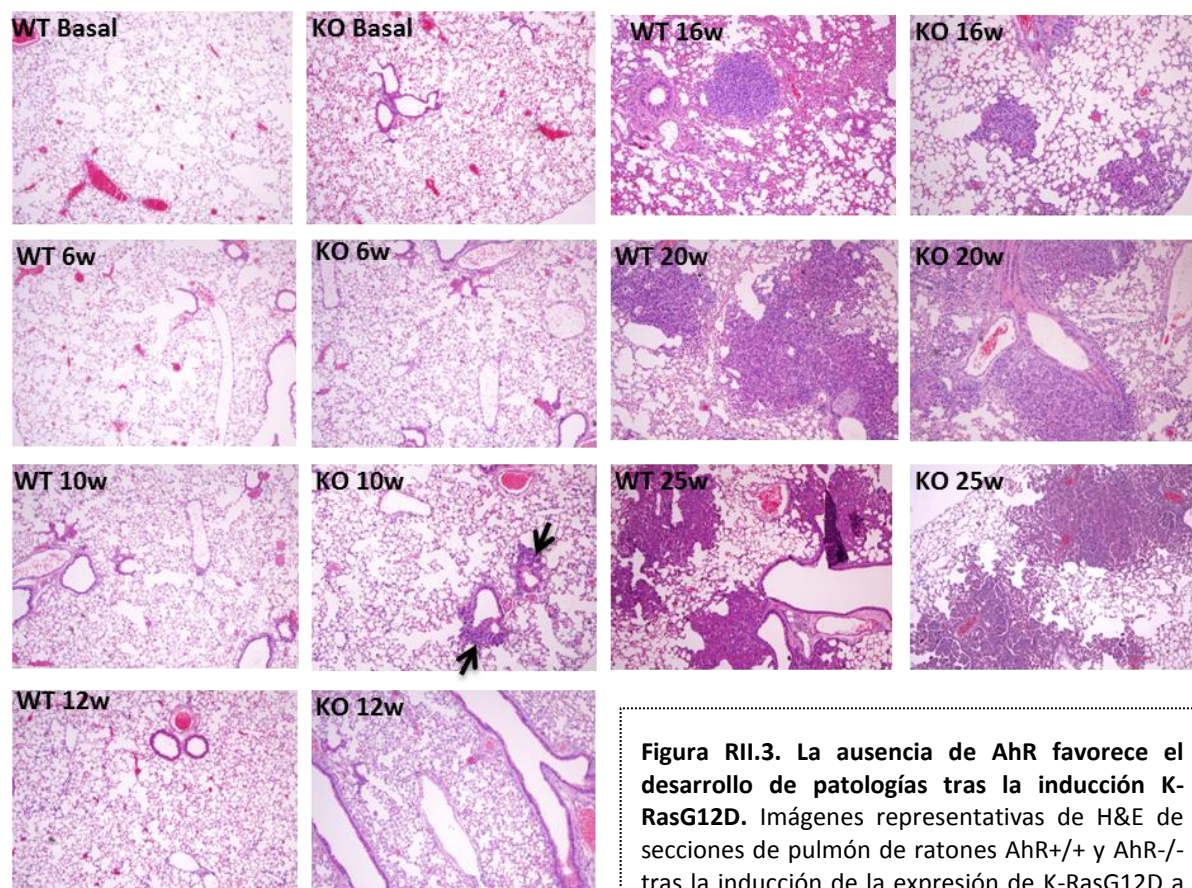




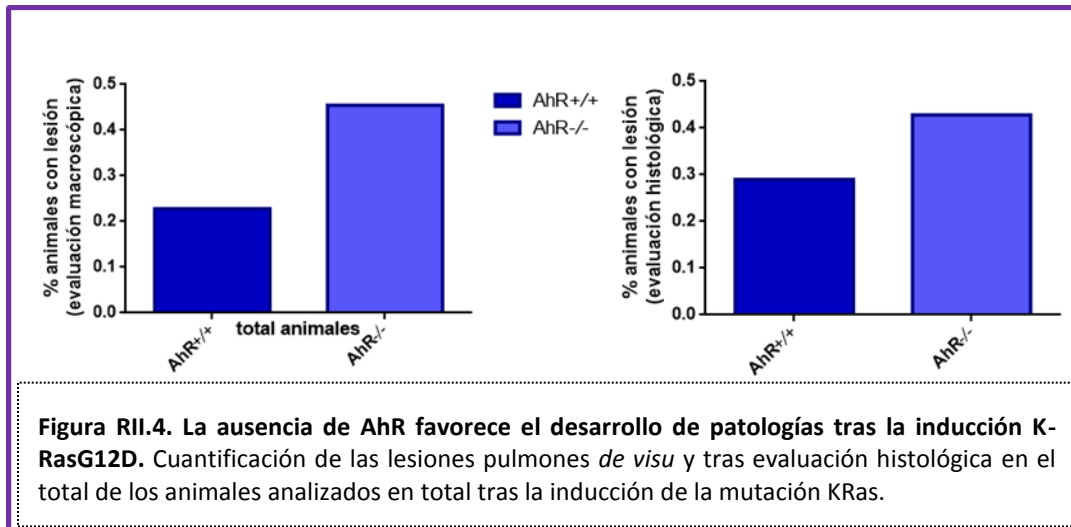
**Figura RII.2. La ausencia de AhR favorece el desarrollo de patologías tras la inducción K-RasG12D.** cuantificación de animales analizados con lesiones pulmones *de visu* y tras evaluación histológica a los tiempos indicados tras la inducción del oncogén K-Ras.

## 2. El proceso tumoral generado por la mutación KRasG12D en pulmón se desarrolló de forma más lesiva en ausencia de AhR

En la evaluación macroscópica de los lóbulos pulmonares, un 45% de los animales carentes de AhR en total presentaron lesiones, frente a un 23% de los *AhR*<sup>+/+</sup>, lo cual nos indica que la progresión de los adenocarcinomas se desarrolla de una forma más evidente en ausencia del receptor. Figura RII.4. En los últimos estadios de progresión analizados, a las 60-65 semanas tras la inducción, observamos una incidencia de adenomas sólidos y papilares en un 60% de las lesiones de ratones *AhR*<sup>-/-</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup> frente a un 25% en las lesiones de ratones *AhR*<sup>+/+</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup>.



**Figura RII.3. La ausencia de AhR favorece el desarrollo de patologías tras la inducción K-RasG12D.** Imágenes representativas de H&E de secciones de pulmón de ratones AhR+/+ y AhR-/- tras la inducción de la expresión de K-RasG12D a los tiempos indicados (semanas)



El número de lesiones cuantificadas, así como el examen histopatológico de los tejidos indican que la ausencia de AhR favoreció la progresión de los tumores pulmonares provocados por la mutación KRas G12D.

3. Los ratones  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$  presentaron una proporción más elevada de células progenitoras/iniciadoras de tumor en estadios de inducción tempranos.

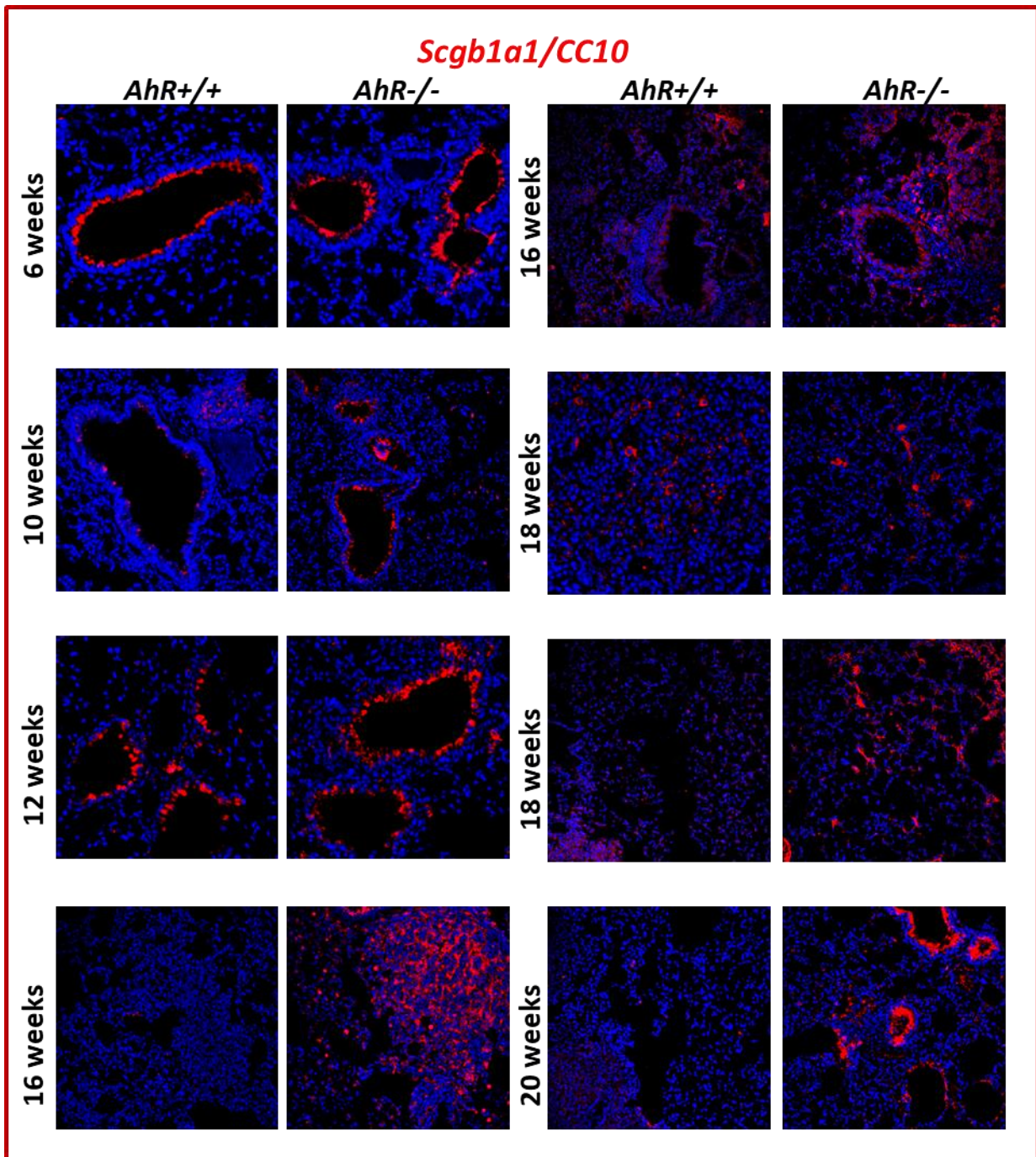
Las células Clara son células secretoras que se encuentran en los bronquiolos pulmonares y que producen específicamente las proteínas Scgb1b1 o CC10. Se ha demostrado que estas células son capaces de autorrenovarse en el epitelio pulmonar tras una lesión, funcionando como células progenitoras con capacidad de proliferdiferenciarse a células ciliadas, restaurando de este modo el bronquiolo dañado (Rock & Hogan, 2011). Para comprobar la proporción de células progenitoras CC10+ y la localización de las mismas en el pulmón de ratones  $AhR^{+/+}/KRas^{LSL-G12D/+}$  y  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$  durante el desarrollo de tumores, analizamos mediante inmunofluorescencia el marcador de células clara Scgb1a1. En la Figura RII.5 se muestra como las células Clara se localizaron en el

epitelio bronquiolar en ausencia de lesiones en ambos genotipos, si bien el porcentaje de células Scgb1a1 positivas fue mayor en las secciones de pulmones *AhR*<sup>-/-</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup> tal como pudo observarse tras su cuantificación (Figura RII.7). Tras la inducción de la mutación *KRas*G12D las células Clara proliferaron y se expandieron, encontrándose células Scgb1a1 positivas por todas las regiones con hiperplasia de nuevo en mayor número en pulmón de ratones *AhR*<sup>-/-</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup>.

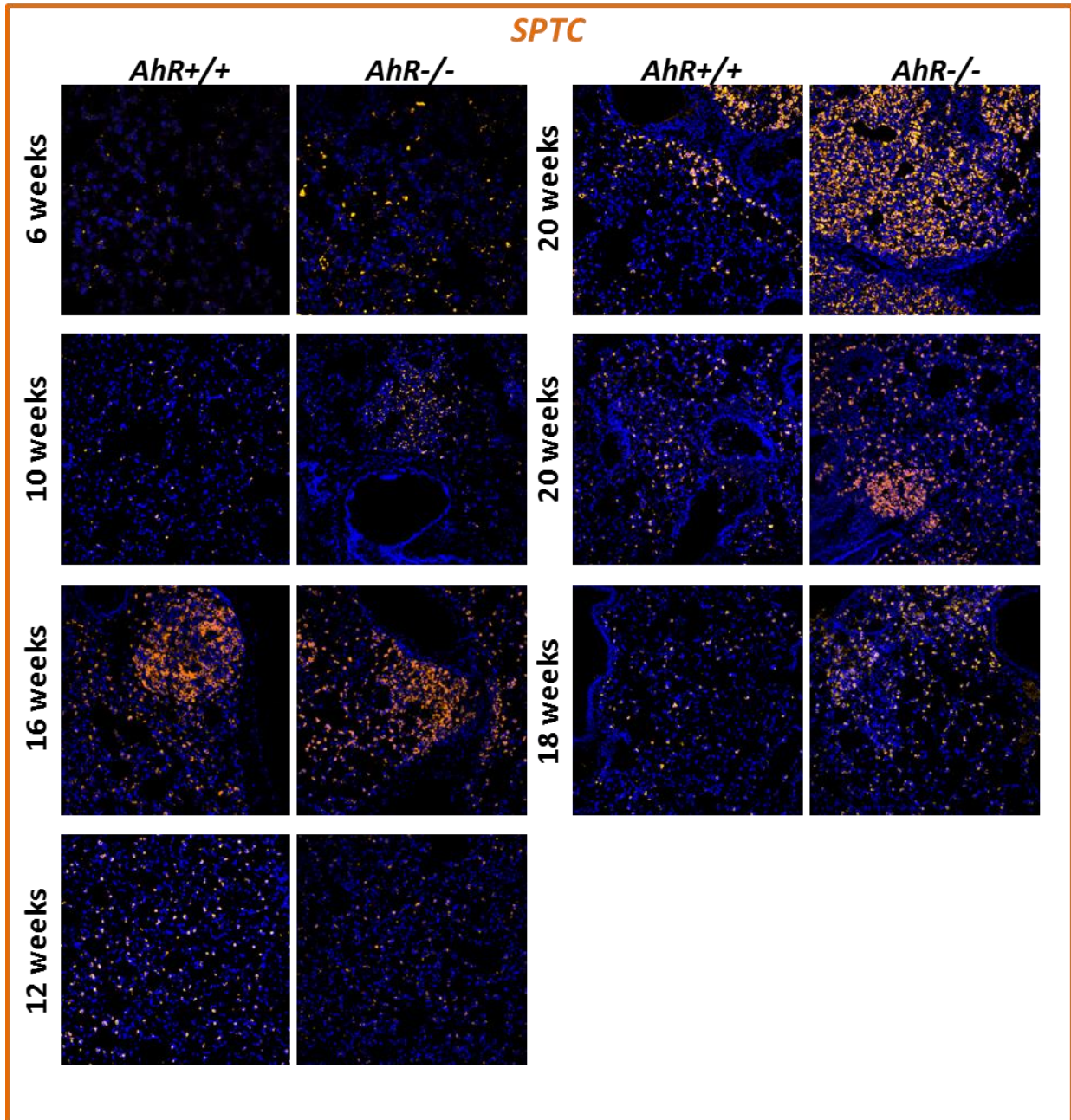
Las células alveolares de tipo II son otro tipo celular con capacidad stem en el pulmón. Estas células producen la proteína tensioactiva surfactante pro-SPTC y tienen capacidad de autorrenovación y diferenciación a células alveolares de tipo I, encargadas del intercambio de gases (Barkauskas et al., 2013). En los experimentos de inmunofluorescencia para el marcador específico de células alveolares de tipo II SPTC observamos que, de forma similar a las células Clara, las células SPTC<sup>+</sup> se expandieron a medida que avanzó la proliferación hiperplásica (Figura RII.6). La cuantificación de las células SPTC positivas indicó que la proporción de células alveolares de tipo II presentes en el pulmón *AhR*<sup>-/-</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup> fue superior a la existente en el pulmón de ratones *KRas*G12D que expresan un *AhR* funcional (Figura RII.7).

**Las células progenitoras con capacidad proliferativa que se generan en el pulmón tras la inducción del oncogén *KRas*G12D, se encontraron en una proporción mayor en ausencia del receptor *AhR*.**

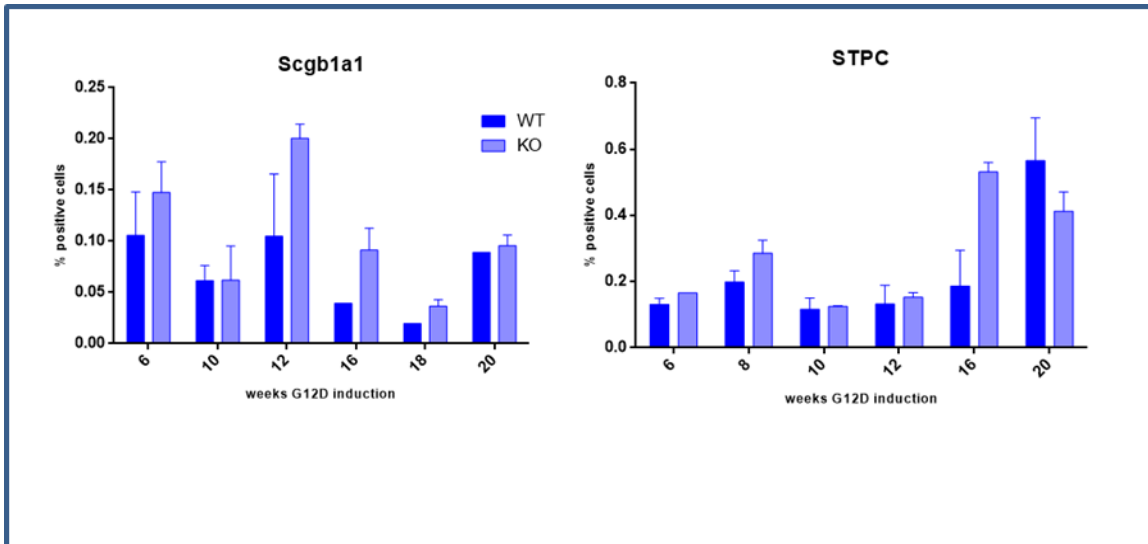




**Figura RII.5. *Scgb1a1* se sobreexpresa en pulmones *AhR*<sup>-/-</sup>.** Ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> fueron tratados con Adeno-Cre activando la expresión de la versión oncogénica de K-Ras. Los animales fueron sacrificados a los tiempos indicados (semanas). Se realizaron secciones del tejido pulmonar y las células clara fueron analizadas mediante inmunofluorescencia utilizando el marcador *Scgb1a1* (Alexa-633). Se utilizó DAPI para teñir los núcleos celulares. Las secciones fueron analizadas en microscopio confocal Olympus FV1000 con el software FV10 (Olympus)



**Figura RII.6. Los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> presentan mayor expresión del marcador SPTC.** Ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> fueron tratados con Adeno-Cre activando la expresión de la versión oncogénica de K-Ras. Los animales fueron sacrificados a los tiempos indicados (semanas). Se realizaron secciones del tejido pulmonar y las células clara fueron analizadas mediante inmunofluorescencia utilizando el marcador SPTC (Alexa-550). Se utilizó DAPI para teñir los núcleos celulares. Las secciones fueron analizadas en microscopio confocal Olympus FV1000 con el software FV10 (Olympus).



**Figura RII.7. Los animales *AhR*<sup>-/-</sup> presentan más células progenitoras en pulmón.** Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal se utilizaron para cuantificar el porcentaje de células que expresan Scgb1a1 y SPTC. Tres secciones de al menos dos replicas biológicas fueron analizadas para cada marcador utilizando el programa Image J.

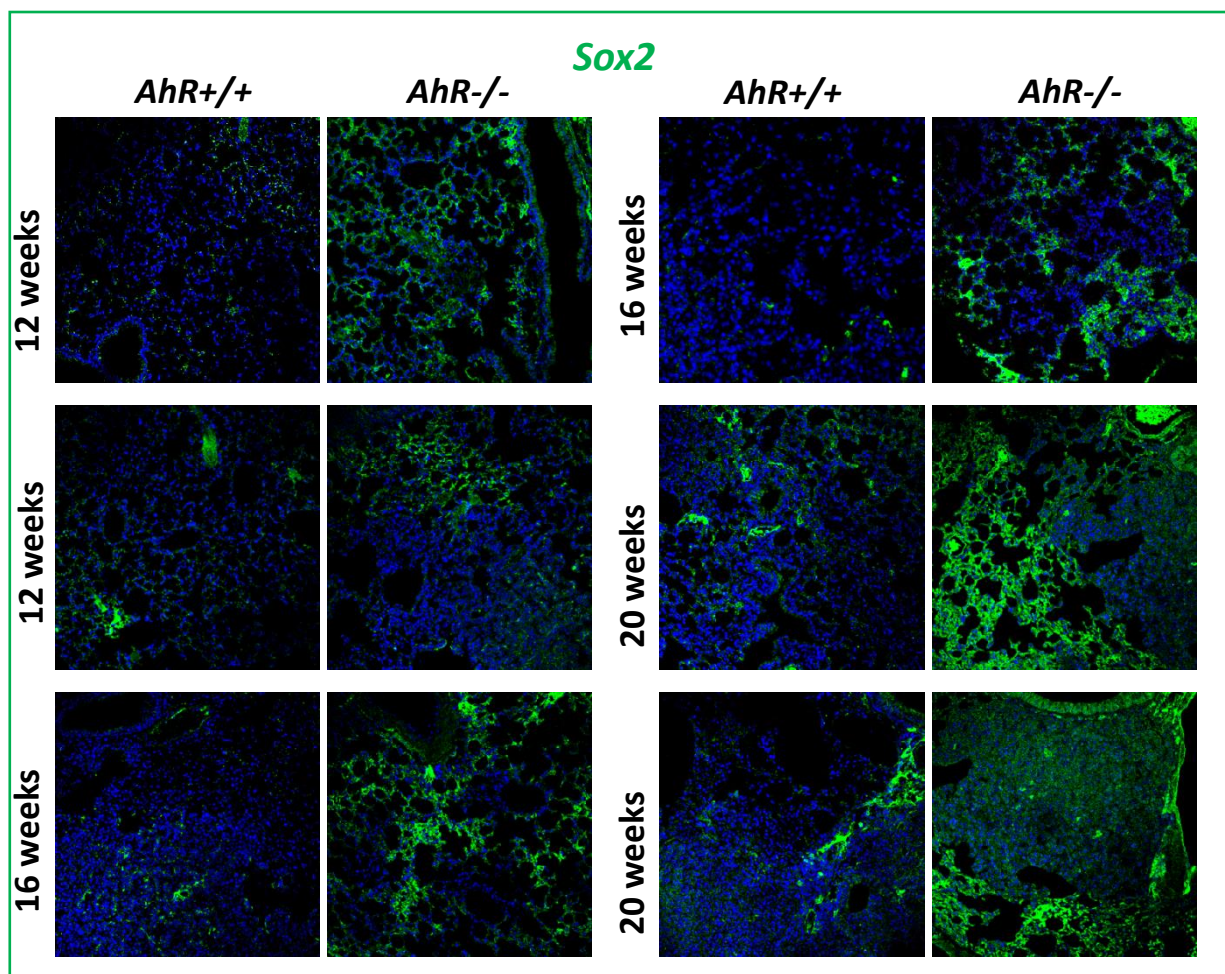
#### 4. El marcador de pluripotencia Sox2 se encontró sobreexpresado en los tumores de pulmones *AhR*<sup>-/-</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup>.

Sox2 es un factor de pluripotencia que participa en el mantenimiento del estado *stemness* y en el correcto funcionamiento de las células madre en numerosos tejidos adultos. Sox2 también participa en la diferenciación de células pulmonares (B. R. Kim et al., 2016) y recientemente se ha demostrado que suprime la expresión del inhibidor del ciclo celular CDKN1A. A través de ambos mecanismos, Sox2 sostiene el crecimiento de las células tumorales escamosas pulmonares (Fukazawa et al., 2016). Mediante ensayos de inmunofluorescencia, hemos estudiado la expresión de este marcador de células madre durante la progresión tumoral inducida por la activación del oncogén *KRas*G12D en animales *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup>. Hemos comprobado que los pulmones de ratones *AhR*<sup>-/-</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup> sobreexpresaron Sox2 desde las 12 a las 20 semanas tras la inducción a un nivel superior al presente en los pulmones *AhR*<sup>+/+</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup> (Figura RII.8). Este



periodo en el cual Sox2 se expresó a niveles más elevados coincide con el de mayor incidencia de hiperplasias y adenomas pulmonares en ratones  $AhR^{-/-}/Kras^{LSL-G12D/+}$ .

Los pulmones de ratones  $AhR^{-/-}/Kras^{LSL-G12D/+}$  sobreexpresaron el marcador de pluripotencia Sox2 durante el desarrollo tumoral inducido por el oncogén KRasG12D.



**Figura RII.8. Sox2 se sobreexpresa en ausencia de AhR.** Ratones  $AhR^{+/+}$  y  $AhR^{-/-}$  fueron tratados con Adeno-Cre activando la expresión de la versión oncogénica de K-Ras. Los animales fueron sacrificados a los tiempos indicados (semanas). Se realizaron secciones del tejido pulmonar y se analizó la expresión del marcador de *stem cells* Sox2 (Alexa-488). Se utilizó DAPI para teñir los núcleos celulares. Las secciones fueron analizadas en microscopio confocal Olympus FV1000 con el software FV10 (Olympus)



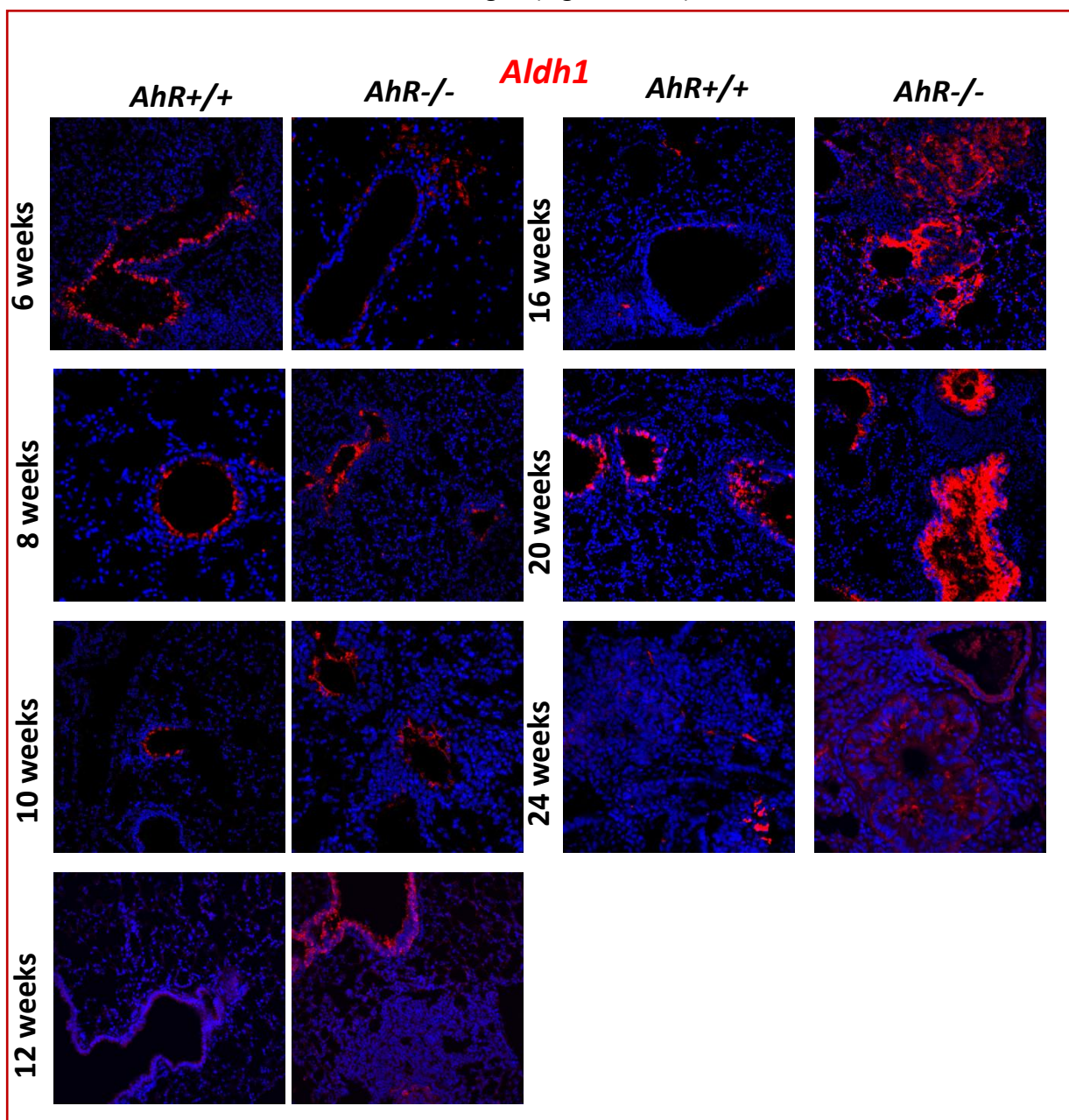
## 5. La expresión de marcadores de células madre cancerosas aumentó durante el desarrollo de adenocarcinomas pulmonares en ausencia de AhR.

Las células madre tumorales (*Cancer Stem Cells*, CSCs) representan una pequeña fracción del total de células que componen el tumor. Sin embargo, de ellas depende en gran medida su propagación y su resiliencia frente a los tratamientos. En este estudio, decidimos analizar los niveles de expresión de varios marcadores de células madre tumorales en el pulmón de ratones  $AhR^{+}/+/KRas^{LSL-G12D/+}$  y  $AhR^{-}/-/KRas^{LSL-G12D/+}$  con el fin de investigar el papel del receptor en la progresión del adenocarcinoma pulmonar.

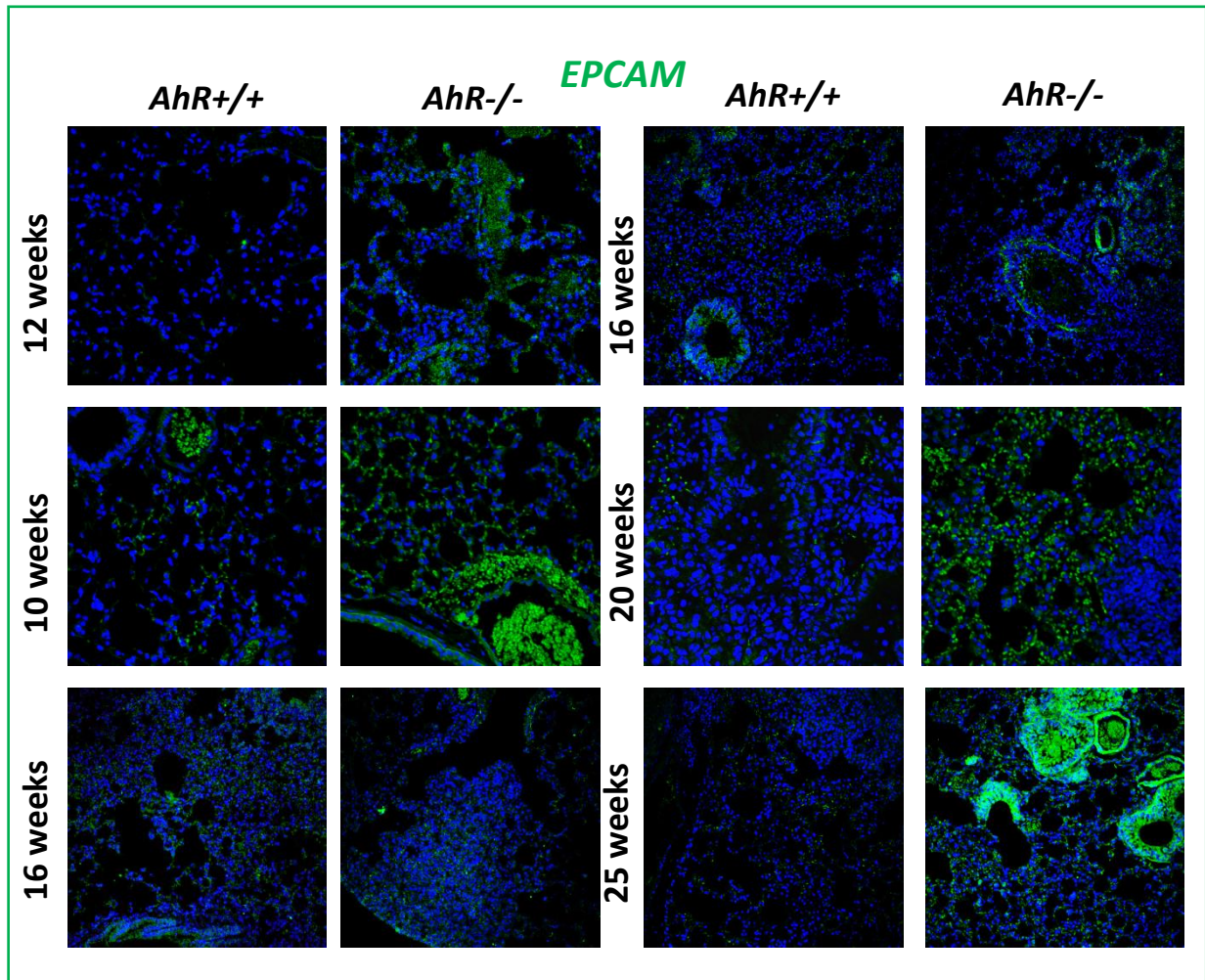
La enzima aldehído deshidrogenasa (Aldh) se encarga de oxidar aldehídos intracelulares y juega un papel relevante en la oxidación de retinol a ácido retinoico durante la diferenciación temprana de las células madre. Una expresión elevada de esta enzima se ha puesto de manifiesto en células madre hematopoyéticas y neurales (HSU, CHANG, HOFFMANN, & DUESTER, 1999). Además, se ha identificado que ALDH1 es un marcador de células madre tumorales en varias neoplasias malignas humanas, incluyendo el cáncer de pulmón (Jiang et al., 2009). El análisis por inmunofluorescencia de la isoforma Aldh1a1 reveló que las lesiones originadas en ratones  $AhR^{-}/-/KRas^{LSL-G12D/+}$  a partir de las 12 semanas de inducción del oncogén, contenían un mayor número de células que expresaban este marcador de CSC que las lesiones presentes en pulmones  $AhR^{+}/+/KRas^{LSL-G12D/+}$  (Figura RII.9).

EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) es una proteína de membrana implicada en adhesión celular que se encuentra sobreexpresada en células progenitoras. EpCAM juega un papel importante (Schmelzer & Reid, 2008)<sup>[OBJ]</sup>. Por otro lado, se encuentra también sobreexpresada en tumores epiteliales presentes en cánceres como el de mama, gástrico, esófago y (Kimura et al., 2007)<sup>[OBJ]</sup>. Interesantemente para este estudio, la proteína EpCAM está implicada en la carcinogénesis del adenocarcinoma pulmonar y ha sido propuesta como una diana terapéutica (Youngwook Kim et al., 2009)<sup>[OBJ]</sup>. En el estudio de la

expresión de EpCAM por inmunofluorescencia en cortes de pulmón de ratones  $AhR^{+/+}/KRas^{LSL-G12D/+}$  y  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$ , hemos observado que este marcador se expresó a un nivel más elevado en ausencia de AhR en aquellas hiperplasias generadas a las 20 semanas tras la inducción del oncogén (Figura RII.10).



**Figura RII.9. En tumores AhR<sup>-/-</sup> la expresión de Aldh1a1 es superior.** Ratones AhR<sup>+/+</sup> y AhR<sup>-/-</sup> fueron tratados con Adeno-Cre activando la expresión de la versión oncogénica de K-Ras. Los animales fueron sacrificados a los tiempos indicados (semanas). Se realizaron secciones del tejido pulmonar y las células madre tumorales fueron analizadas mediante inmunofluorescencia utilizando el marcador Aldh1 (Alexa-633). Se utilizó DAPI para teñir los núcleos celulares. Las secciones fueron analizadas en microscopio confocal Olympus FV1000 con el software FV10 (Olympus)



**Figura RII.10. En ausencia de AhR aumenta la expresión de EPCAM.** Ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> fueron tratados con Adeno-Cre activando la expresión de la versión oncogénica de K-Ras. Los animales fueron sacrificados a los tiempos indicados (semanas). Se realizaron secciones del tejido pulmonar y se analizó la expresión del marcador EPCAM (Alexa-488). Se utilizó DAPI para teñir los núcleos celulares. Las secciones fueron analizadas en microscopio confocal Olympus FV1000 con el software FV10 (Olympus)

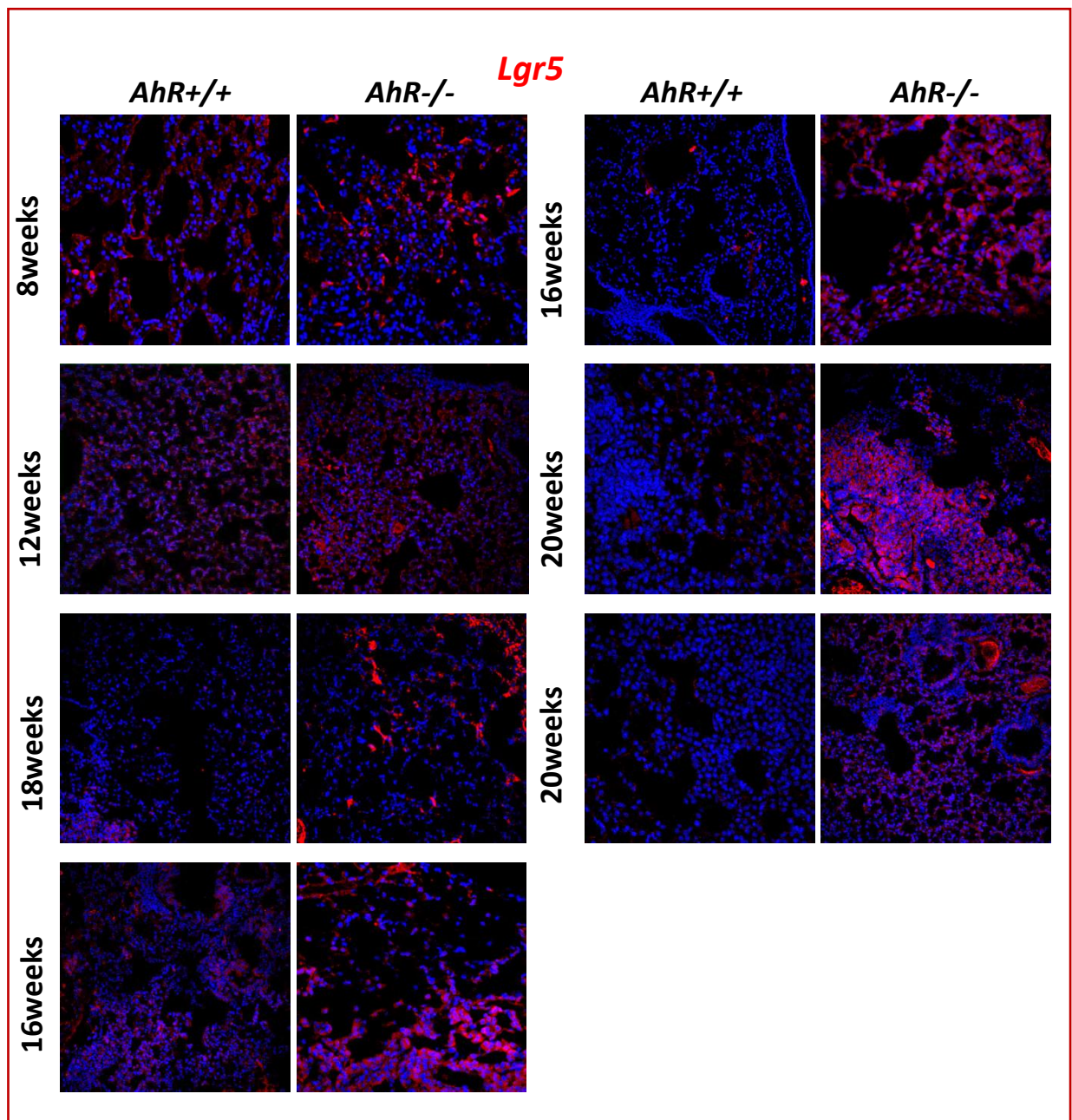
Lgr5 es un receptor acoplado a proteínas G que contiene repeticiones ricas en leucina. Se ha demostrado que se expresa de forma específica en células madre de múltiples tejidos epiteliales, así como en adenomas intestinales (Huch et al., 2013). Lgr5 es un gen diana de la ruta de Wnt, funcionalmente involucrado en la amplificación de señalización y en el

mantenimiento de células madre en múltiples tejidos (de Lau, Peng, Gros, & Clevers, 2014).

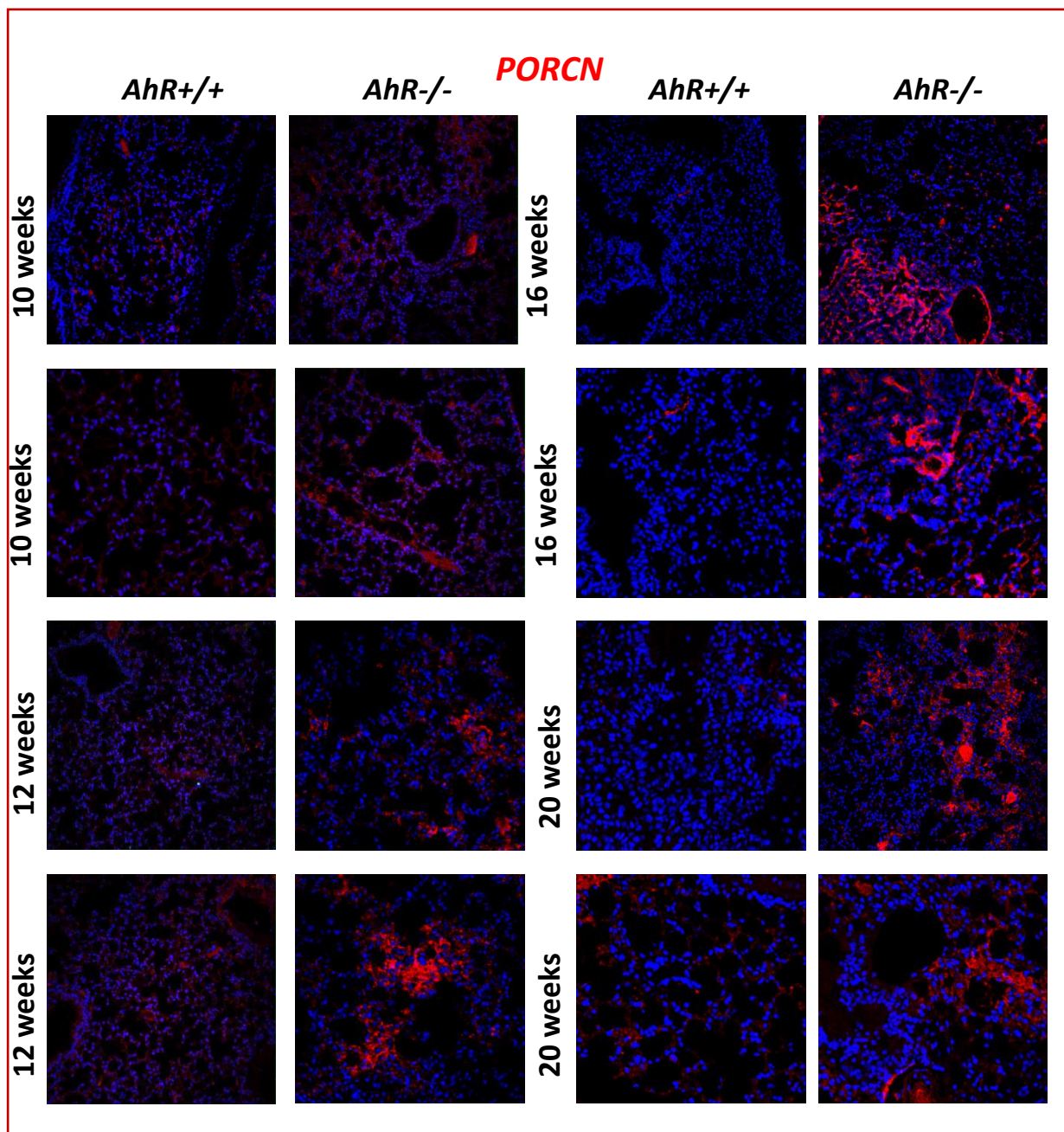
Su análisis mostró que las células Lgr5 positivas se expandieron con una mayor frecuencia en las lesiones pulmonares de los animales *AhR*<sup>-/-</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup> que en las de los *AhR*<sup>+/+</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup>. Como puede observarse en la Figura RII.11, a partir de las 16 semanas de la inducción del oncogén, la expresión de Lgr5 se mantuvo a un nivel superior en los pulmones carentes de receptor AhR, sugiriendo una mayor proliferación de estas células madre tumorales.

La proliferación de las células Lgr5 positivas se mantiene debido a la acción de factores de crecimiento de la ruta Wnt. Para la secreción de estos factores de crecimiento son necesarias reacciones de palmitoilación por parte una enzima acetiltransferasa de membrana presente en las células secretoras denominada PORCN. Esta proteína constituye un marcador de células del nicho que mantiene la actividad proliferativa de las células madre responsables del crecimiento del tumor (Tammela et al., 2017). Decidimos evaluar la proporción de células secretoras de estos factores de crecimiento durante la progresión de las lesiones pulmonares causadas por la mutación *KRas*<sup>G12D</sup>. Los resultados obtenidos mostraron que las células secretoras que mantienen el nicho (PORCN+) se encontraron a un nivel de representación mayor a partir de las 12-16 semanas en lesiones de ratones *AhR*<sup>-/-</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup> que en lesiones de ratones *AhR*<sup>+/+</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup> (Figura RII.12).





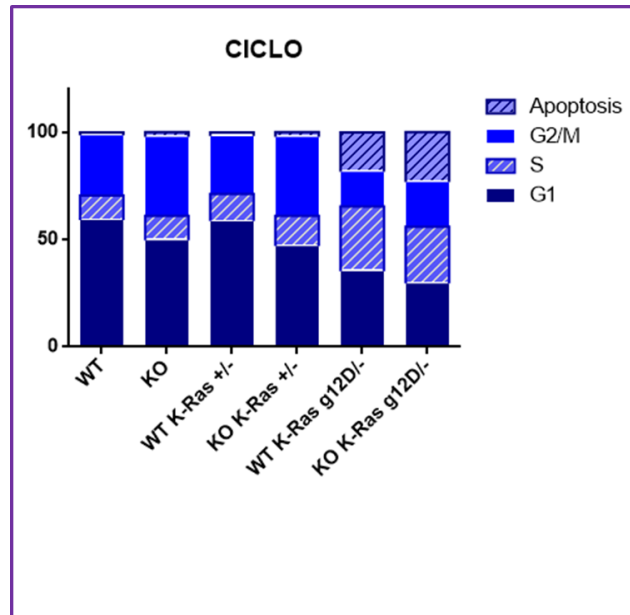
**Figura RII.11. La expansión de células Lgr5<sup>+</sup> es superior en *AhR*<sup>-/-</sup>.** Ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> fueron tratados con Adeno-Cre activando la expresión de la versión oncogénica de K-Ras. Los animales fueron sacrificados a los tiempos indicados (semanas). Se realizaron secciones del tejido pulmonar y se analizó la expresión del marcador Lgr5 (Alexa-633). Se utilizó DAPI para teñir los núcleos celulares. Las secciones fueron analizadas en microscopio confocal Olympus FV1000 con el software FV10 (Olympus)



**Figura RII.12. La ausencia de AhR promueve la existencia de un nicho proliferativo.** Ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> fueron tratados con Adeno-Cre activando la expresión de la versión oncogénica de K-Ras. Los animales fueron sacrificados a los tiempos indicados (semanas). Se realizaron secciones del tejido pulmonar y las células del nicho fueron analizadas mediante inmunofluorescencia utilizando el marcador PORCN (Alexa-633). Se utilizó DAPI para teñir los núcleos celulares. Las secciones fueron analizadas en microscopio confocal Olympus FV1000 con el software FV10 (Olympus)

## 6. La ausencia de AhR afectó a la progresión del ciclo celular de los fibroblastos embrionarios KRasG12D

Con el objetivo de estudiar la influencia de AhR en proliferación, apoptosis y progresión a través del ciclo de las células conteniendo la mutación KRasG12D, realizamos cultivos primarios de fibroblastos embrionarios (*Mouse Embryonic Fibroblasts, MEF*) a partir de ratones  $AhR^{+/+}/KRas^{LSL-G12D/+}$  y  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$ . Tras la obtención y expansión de los cultivos, estos fueron infectados con Adeno-Cre para activar el oncogén. La eficiencia de la infección se comprobó analizando la presencia del *gen reporter* GFP. El análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo mostró que los MEFs  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$  incrementan el porcentaje de células en la transición G2/M con respecto a los MEFs  $AhR^{+/+}/KRas^{LSL-G12D/+}$ , lo que puede reflejar una mayor dificultad para entrar en mitosis (Figura RII.13). Este efecto no se produjo en MEFs en los que el oncogén permaneció inactivo por ausencia de recombinasa Cre. Adicionalmente, una vez inducida la expresión de KRasG12D en ambos genotipos, se observó un incremento significativo en el número de células en fase S, indicando un aumento de proliferación celular. Tanto los MEFs  $AhR^{+/+}/KRas^{LSL-G12D/+}$  como los  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$  mostraron un notable aumento en sus niveles de apoptosis, siendo el porcentaje superior en MEFs carentes de AhR. Este resultado sugiere que la carencia del receptor puede tener un efecto aditivo parcial con la expresión del oncogén en la inducción de apoptosis (Figura RII.13).



**Figura RII.13.** Los fibroblastos embrionarios fueron analizados para la proporción del ciclo celular mediante citometría de flujo. Se indica el porcentaje de células en cada una de las fases.

La versión oncogénica de KRasG12D provocó un aumento en la proporción de células en fase S. La ausencia de AhR incrementó tanto la población de fibroblastos embrionarios en la transición G2/M como la tasa apoptótica.



## DISCUSIÓN II

## DISCUSIÓN II

---

La señalización mediada por la GTPasa KRas se ha estudiado intensamente durante más de 40 años debido al gran número de tipos de cáncer en los que su desregulación está implicada. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha desarrollado ninguna estrategia terapéutica efectiva para tratar las patologías ocasionadas por mutaciones en KRas. En los últimos años, se han desarrollado modelos de ratones genéticamente modificados con el fin de reproducir el desarrollo de los tumores debidos a la actividad constitutiva de KRas, así como de dilucidar los eventos moleculares responsables del inicio y la progresión de estos tumores. e El estudio de la interacción de KRas con otras vías de señalización implicadas en cáncer puede resultar de enorme utilidad para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas que modulen la progresión del cáncer en general y de los adenocarcinomas en particular.

El receptor AhR tiene un importante papel en desarrollo tumoral. Los estudios realizados hasta la fecha, han demostrado que este receptor puede tener actividad oncogénica o bien actuar como supresor tumoral dependiendo del fenotipo de la célula diana y del contexto en el que se desarrolle el tumor. AhR interacciona con rutas de señalización que regulan ciclo celular, adhesión y migración, apoptosis, angiogénesis, diferenciación y pluripotencia (Angelos & Kaufman, 2018; Mulero-Navarro & Fernandez-Salguero, 2016) . Su implicación en tumorigénesis lo sugiere como un potencial marcador diagnóstico y pronóstico en este tipo de patologías. En este trabajo, hemos combinado dos modelos animales modificados genéticamente: uno que carece de la expresión de AhR (*AhR*<sup>-/-</sup>) y otro que expresa de manera inducible la mutación humana G12D en el oncogén KRas. Con ello hemos generado el modelo murino *AhR*<sup>-/-</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup> y su línea control *AhR*<sup>+/+</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup> que han sido utilizadas para determinar si AhR ejerce algún efecto en la progresión de los adenocarcinomas pulmonares derivados de la mutación KRasG12D.

La activación de la expresión de KRasG12D en los animales carentes de AhR originó una aparición más temprana de las lesiones pulmonares. La expresión de la recombinasa Cre en las células pulmonares se indujo mediante infección adenovírica intranasal, infectándose, por tanto en primer lugar, las células epiteliales que cubren los conductos bronquiolares. Hemos comprobado que en los animales  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$  la población de células progenitoras que se localizó en el epitelio bronquioalveolar (Scgb1a1+) resultó ser superior a la presente en los ratones  $AhR^{+/+}/KRas^{LSL-G12D/+}$ , en concordancia con lo observado en nuestros estudios previos, en los que demostramos que en ausencia de AhR la regeneración pulmonar se veía favorecida por una expansión de estos tipos celulares indiferenciados (Morales-Hernandez et al., 2017). Como hemos observado mediante inmunofluorescencia, durante el desarrollo tumoral, estas células se expandieron y pasaron a formar parte de las lesiones hiperplásicas en mayor proporción en ausencia de receptor. Esto nos indica que estos tipos celulares *stem-like* podrían contribuir al inicio del tumor causado por la mutación KRasG12D en pulmón, viéndose este efecto potenciado en un contexto carente de la expresión de AhR. Las células alveolares de tipo II, características por la expresión del marcador SPTC, también se encontraron en una proporción superior en los tumores pulmonares de los ratones  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$ , de nuevo sugiriendo que una de las posibles causas por las que la ausencia de AhR facilita la aparición de lesiones, en un contexto KRasG12D, sea la elevada población de células indiferenciadas que presentan de manera basal y al inicio del proceso tumorigénico. En concordancia con los resultados previos obtenidos en diferentes tejidos (Morales-Hernandez et al., 2017; Moreno-Marin et al., 2017), en los que hemos observado que la ausencia de AhR favorece un estado indiferenciado, aquí, hemos mostrado que los animales  $AhR^{-/-}/KRas^{LSL-G12D/+}$  mantuvieron sobreexpresión de los marcadores de CSC Aldh1a1 y EpCAM a lo largo del desarrollo de los adenocarcinomas pulmonares. Sox2, un factor de transcripción implicado en desarrollo embrionario, regula las decisiones de destino celular y la diferenciación. Además, ha sido asociado con la progresión tumoral y con la metástasis en varios tipos de cáncer, incluidos los de mama, próstata, pulmón, ovario y colon (Chaudhary et al., 2019). Como hemos demostrado en anteriores

anteriores, AhR inhibe la expresión de Sox2, al igual que la de otros factores de pluripotencia (M. Contador-Troca et al., 2013). En células *stem-like* aisladas de pulmones de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> pudimos observar cómo los factores de pluripotencia Oct4 y Nanog estuvieron sobreexpresados en ausencia de AhR (Morales-Hernandez et al., 2017). En este trabajo, hemos comprobado que Sox2 se encuentra sobreexpresado en los pulmones de los animales *AhR*<sup>-/-</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup> con respecto a los *AhR*<sup>+/+</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup>. Estos resultados avalan la hipótesis de que los animales carentes del receptor sean más proclives al desarrollo de lesiones pulmonares provocadas por KRasG12D, ya que se sabe que la inhibición de Sox2 atenúa la progresión del adenocarcinoma pulmonar (W. Chen et al., 2018).

La ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina tiene una enorme importancia en el desarrollo del adenocarcinoma pulmonar (Tammela et al., 2017). Las células Lgr5 positivas son muy relevantes en el mantenimiento de la actividad proliferativa durante la progresión de la lesión hiperplásica en respuesta a ligandos que activan la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina. En trabajos anteriores de nuestro grupo, hemos descubierto que AhR reprime esta vía de señalización para promover la diferenciación hepática (Moreno-Marín et al., 2018). Aquí, hemos observado como a lo largo de la progresión de las lesiones pulmonares originadas tras la activación de la mutación KRasG12D, la expresión del marcador Lgr5 aumentó en los animales carentes de AhR, al igual que lo hizo la población de células capaces de secretar ligandos que mantienen la proliferación PRCN positivas. Estos resultados indican que la regulación positiva que experimenta la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina en ausencia de AhR puede favorecer la aparición de adenocarcinomas pulmonares causados por la actividad oncogénica de KRasG12D.

## CONCLUSIONES II

## CONCLUSIONES II

---

**La ausencia de AhR promueve el desarrollo de adenocarcinomas pulmonares causados por la actividad oncogénica de KRasG12D.**

- Los ratones *AhR*<sup>-/-</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup> desarrollan lesiones hiperplásicas en pulmón de forma más temprana que los *AhR*<sup>+/+</sup>/*KRas*<sup>LSL-G12D/+</sup> tras la activación de la mutación.
- La ausencia de AhR provoca un aumento de las poblaciones de células progenitoras que expresan Scgb1a1 y SPTC en pulmón.
- Los marcadores propios de células madre tumorales se sobreexpresan en mayor medida en el tejido pulmonar que activa la mutación KRasG12D si el fondo genético es *AhR*<sup>-/-</sup>.

Las células que responden a la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina (Lgr5+), así como las que proporcionan a estas el nicho (PORCN+), se encuentran en mayor proporción en lesiones pulmonares en las que KRasG12D se expresa en un contexto carente de AhR.

## CAPÍTULO III





## INTRODUCCIÓN III

### 1. Envejecimiento

El envejecimiento es un fenómeno biológico que ocurre en todos los organismos con el paso del tiempo y que se caracteriza por una pérdida gradual de función a nivel molecular, celular y tisular. Los sistemas biológicos sufren una degeneración progresiva por la acumulación de cambios que suceden con el avance de la edad y que se traducen en una disminución de las funciones fisiológicas y de la fertilidad, conduciendo, en definitiva, a una pérdida de homeostasis. Este decaimiento general da lugar a patologías asociadas al envejecimiento tales como sarcopenia, aterosclerosis e insuficiencia cardíaca, osteoporosis, degeneración macular, insuficiencia pulmonar y renal y neurodegeneración entre otras.

Interesantemente, en aquellos organismos que presentan capacidad de regeneración tisular, se originan también durante el proceso de envejecimiento patologías hiperplásicas. En este tipo de patologías, en lugar de perderse funciones celulares, las células adquieren otras nuevas y aberrantes que les permiten proliferar sin límite y colonizar nuevos tejidos (Campisi & Robert, 2014). El vínculo entre el cáncer y el envejecimiento es ampliamente conocido y, de hecho, actualmente se considera a la edad como el factor de riesgo más significativo para la mayoría de las neoplasias malignas comunes. La incidencia de neoplasias en mama, pulmón, próstata, colon y recto, estómago, tiroides, páncreas y ovario, así como algunos tipos de leucemia, aumentan exponencialmente con la edad. Aproximadamente la mitad de todos los cánceres son diagnosticados en pacientes mayores de 65 años, y la mayoría de los pacientes con neoplasias malignas comunes son adultos mayores (X. Zhang, Meng, Chen, Leng, & Zhang, 2017).

Con el envejecimiento, las funciones de los órganos se ven comprometidas en gran medida por una disminución de la capacidad regenerativa de las células madre que se encuentran en los tejidos adultos, siendo éstas las encargadas de la regeneración tras cualquier daño. Durante el proceso de envejecimiento, la disfunción de estas poblaciones celulares provoca un acúmulo gradual de daños tisulares no reparados, que conllevan al deterioro de las funciones orgánicas (Keyes & Fuchs, 2018). La pérdida de renovación de las células madre provoca cambios en la fisiología del tejido que impacta en la salud del organismo y en su viabilidad. Los mecanismos que subyacen al deterioro de las funciones de estas células, impidiendo su auto-renovación, pueden ser tanto alteraciones intrínsecas debido al paso del tiempo, como acortamiento de los telómeros, cambios en la proteostasis, modificaciones epigenéticas, acumulación de daño en el ADN, carga mutacional y disfunción mitocondrial.

Las características del envejecimiento pueden dividirse en tres categorías: (1) Primaria, incluye las causas del daño asociado a la edad; (2) Antagonista, corresponde a las respuestas al daño; y (3) Integradoras, abarca las consecuencias de las respuestas y las que son responsables del fenotipo de envejecimiento (McHugh & Gil, 2018). La senescencia, una respuesta celular que limita la proliferación de células envejecidas o dañadas (Muñoz-Espín et al., 2013; Muñoz-Espín & Serrano, 2014), pertenece a la clase antagonista. Se trata de una respuesta que desempeña funciones fisiológicas durante el desarrollo normal y que es necesaria para la homeostasis de los tejidos. El acúmulo de daños asociados al envejecimiento, como la inestabilidad genómica y el desgaste de los telómeros, desencadena esta respuesta celular en los tejidos envejecidos. También hay un vínculo entre la senescencia y otras características antagónicas del envejecimiento. Por ejemplo, las células senescentes presentan una disminución de la mitofagia, lo que resulta en una red mitocondrial defectuosa que puede contribuir a la disfunción metabólica en organismos envejecidos (Sun, Youle, & Finkel, 2016).

## 2. Senescencia

Casi todas las patologías relacionadas con el envejecimiento, tanto las de origen degenerativo como las de origen hiperplásico, están vinculadas a una respuesta celular a estrés denominada senescencia. La senescencia es un mecanismo de respuesta que experimentan las células sometidas a un estrés potencialmente oncogénico y que consiste en una parada irreversible del ciclo celular, cambios generalizados en la organización de la cromatina y modificaciones en los patrones de expresión génica. Estos cambios incluyen la secreción de numerosas citocinas proinflamatorias, quimocinas, factores de crecimiento y proteasas. Esta característica de las células senescentes se denomina fenotipo secretor asociado a senescencia (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*, SASP) (Campisi & di Fagagna, 2007).

La senescencia celular se describió por primera vez hace aproximadamente cinco décadas cuando Hayflick y colaboradores mostraron que los fibroblastos humanos no podían mantenerse indefinidamente en cultivo. Se comprobó entonces que la replicación de las células era finita y que, en cierto momento, experimentaban senescencia celular. El número de divisiones que las células completan al llegar al final de su vida replicativa se denominó límite de Hayflick (Hayflick, 1965; Hayflick & MOORHEAD, 1964).

Desde los inicios del descubrimiento de la senescencia, ésta se vinculó al envejecimiento. Las células senescentes degeneraban en su capacidad replicativa si bien continuaban teniendo actividad metabólica. Tampoco tardó en vincularse con el cáncer como una respuesta fisiológica que limitaba la proliferación desmedida que sucede en las células tumorales (Sager, 1991). Cuando se inicia la respuesta celular de senescencia, el ciclo celular se detiene gracias a la activación de las vías de señalización que actúan como supresores tumorales: p53/p21 y p16<sup>INK4a</sup>/pRB. Hasta el momento, no se conoce ningún contexto fisiológico en el que las células que experimentan senescencia retomen el ciclo

celular; solamente la manipulación genética ha conseguido revertir dicho fenómeno (Beauséjour et al., 2003). Debido a su función inicial en impedir la proliferación de células dañadas, se cree que esta respuesta celular evolucionó como un mecanismo de protección contra el desarrollo de cáncer (Sager, 1991), y supone efectivamente una barrera contra la tumorigénesis. Sin embargo, el SASP presenta múltiples actividades paracrinas, cuya naturaleza sugiere que la senescencia no es tan solo un mecanismo para prevenir el cáncer. Resulta probable que la senescencia celular y el SASP hayan evolucionado también para promover la reparación de tejidos y la regeneración ante una lesión (Campisi, 2013).

Son varias las causas conocidas que llevan a la activación de la respuesta celular de senescencia:

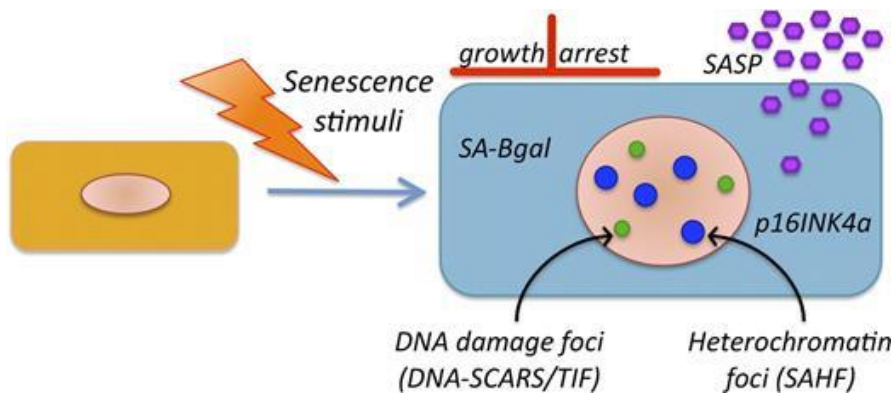
(1) Acortamiento de los telómeros: el DNA lineal no puede replicarse por completo en sus extremos utilizando la maquinaria convencional ya que las DNA polimerasas son unidireccionales y requieren cebadores. Esto hace que los extremos de los cromosomas tiendan a acortarse en cada ronda de división celular, lo que podría llevar a que dichos extremos sean reconocidos por la maquinaria de reparación de roturas de doble cadena (*Double Strand Break*, DSB) originándose ciclos de fusión y roturas cromosómicas resultantes en inestabilidad genómica (F. Rodier et al., 2009).

(2) Daño en el DNA: incluye las roturas de doble cadena inducidas por radiación ionizante, a los inhibidores de topoisomerasa y a otros agentes. Las lesiones causadas por el estrés oxidativo y las roturas de cadena sencilla son potentes inductores de senescencia (Sedelnikova et al., 2004; C. Wang et al., 2009).

(3) Señalización de una tasa de proliferación constante: cuando algunos oncogenes activan de forma crónica ciertas vías de señalización que suponen fuertes estímulos mitogénicos, por ejemplo, la forma oncogénica de H-RASV12, se estimula crónicamente la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), provocando senescencia en células normales (Serrano, Lin, McCurrach, Beach, & Lowe, 1997).

(4) Daño epigenómico: las perturbaciones en el epigenoma pueden provocar una respuesta de senescencia, por ejemplo, la reducción en el nivel de compactación de la cromatina causada por los inhibidores de las histonas desacetilasas, los cuales inducen senescencia al desinhibir el supresor tumoral p16<sup>INK4a</sup> (Munro, Barr, Ireland, Morrison, & Parkinson, 2004).

(5) Activación de supresores tumorales: La activación de las vías de señalización de p53/p21 y p16<sup>INK4a</sup>/pRB inducen senescencia dado que estos factores son potentes inhibidores de la progresión del ciclo celular cuya activación provoca un detenimiento de la división (McConnell, Starborg, Brookes, & Peters, 1998).



**Figura I3.1.** Esquema representativo de las características de las células senescentes (Francis Rodier & Campisi, 2011).

Las células senescentes se caracterizan por la detención del ciclo celular y por la ausencia de marcadores de proliferación. Además, estas células se pueden diferenciar fenotípicamente en cultivo porque aumentan de volumen, se adhieren fuertemente al sustrato y adquieren una morfología más aplanada. Uno de los marcadores más utilizados para identificar células senescentes es la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (*Senescence-Associated  $\beta$ -gal*, SA- $\beta$ -gal). La  $\beta$ -galactosidasa lisosómica endógena se sobreexpresa y acumula específicamente en las células senescentes (B. Y. Lee

et al., 2006), pudiéndose detectar de forma diferencial de la actividad  $\beta$ -galactosidasa no asociada a senescencia a pH 6.0.

### 3. Senescencia y AhR

El vínculo entre AhR y la respuesta celular de senescencia ha sido sugerido en varios trabajos previos. En experimentos iniciales realizados con fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) procedentes de modelos transgénicos *AhR*<sup>-/-</sup>, se observó que estas células deficientes en AhR alcanzaban el estado de senescencia antes que los MEFs *AhR*<sup>+/+</sup> cultivados in vitro (Alexander et al., 1998).

En estudios posteriores, se ha observado que AhR atenúa la inflamación inducida por tabaquismo a través del control de la senescencia en el parénquima pulmonar (Guerrina, Traboulsi, Eidelman, & Bagloli, 2018). Por otro lado, la  $\beta$ -naftoflavona (BNF), ligando de AhR, ejerce un efecto antitumoral en células de cáncer de mama mediante la inhibición del ciclo celular, activando p21 y promoviendo senescencia (C. Wang, Xu, Bu, Bottum, & Tischkau). Los queratinocitos humanos expuestos al ligando carcinogénico TCDD se immortalizan de manera dependiente de AHR, presumiblemente a través de la supresión de los iniciadores clave de senescencia p16<sup>INK4a</sup> y p53 (Ray & Swanson, 2004). El trabajo de Ryu y colaboradores pone de manifiesto que ciertas partículas del ambiente inducen senescencia en células de piel humanas mediante la producción de especies reactivas del oxígeno (**Reactive Oxygen Species**, ROS) a través de la activación de AhR, originando modificaciones epigenéticas que llevan a la inducción de la expresión de p16<sup>INK4A</sup> (Ryu et al., 2019).

Además, AhR desempeña una función importante en la regulación de procesos inflamatorios, lo cual podría contribuir tanto a su implicación en la progresión del cáncer (Gasiewicz, Singh, & Casado) como al fenotipo secretor asociado a senescencia. En

tumores de mama humanos, se ha demostrado que la expresión elevada de AHR se correlaciona con un aumento en la expresión de varios genes de inflamación (IL1B, IL6, TNF, IL8 y CXCR4) e invasión (MMP1, MMP2 y PLAU). Por otro lado, la activación de AhR por ligandos como TCDD y BaP indujo la expresión de IL1B e IL6 en una línea celular tumoral de mama (Vacher et al., 2018).

Se ha propuesto que el papel de AhR en inflamación está vinculado a su interacción con la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B, concretamente a nivel del componente de la misma RelB. En este sentido, se ha descrito la existencia de complejos RelB/AhR que pueden unirse al promotor de genes diana de ambos reguladores transcripcionales como c-Myc en células de hepatoma humano HepG2, de mama MDA-MB-231 y linfoides (Yang et al., 2005). Por otro lado, se ha propuesto que la activación de la expresión de COX-2 por AhR podría contribuir a procesos inflamatorios asociados a progresión tumoral (Degner, Papoutsis, Selmin, & Romagnolo, 2009).

Estudios recientes ponen de manifiesto la relación existente entre la respuesta celular de senescencia y la plasticidad celular. Como se ha mencionado anteriormente, se cree que la senescencia tiene como función primigenia dirigir la remodelación y la reparación de tejidos. Esto se ha demostrado en la regeneración de la piel y del hígado (Demaria et al., 2014); (Krizhanovsky et al., 2008), en el desarrollo (Davaapil, Brockes, & Yun, 2017); (Muñoz-Espín et al., 2013), en la formación de la placenta (Chuprin et al., 2013) y en la reversión del proceso tumoral (Ventura et al., 2007); (Xue et al., 2007). En general, las células senescentes se eliminan eficientemente durante la reparación tisular. Sin embargo, ante un daño severo o crónico, pueden generarse fallos en la reparación que provocan un acúmulo de células senescentes en los tejidos contribuyendo a la enfermedad y al envejecimiento (Muñoz-Espín & Serrano, 2014).

Se ha demostrado que el fenotipo SASP favorece el desarrollo embrionario, el cierre de heridas y el crecimiento tumoral, lo que sugiere que la actividad paracrina de estas células tiene funciones fisiológicas más complejas de las que se les anticipaban. De



hecho, el SASP promueve una respuesta pro-regenerativa a través de la inducción de la capacidad *stemness* de las células implicadas (Ritschka, 2018). De manera similar, los queratinocitos primarios de ratón expuestos a un proceso de SASP exhiben una mayor expresión de marcadores de células madre y una capacidad regenerativa potenciada *in vivo*. Este aumento de la capacidad *stemness* de las células afectadas por la actividad SASP ha sido validada en un estudio reciente dónde demuestran que la senescencia celular producida al inducir la expresión exógena de los factores de pluripotencia, promueve el proceso de reprograming *in vivo*. (Mosteiro, Pantoja, de Martino, & Serrano, 2018)

#### **4. Senescencia y cáncer**

La edad es un importante marcador de mal pronóstico que reduce la supervivencia en numerosos tipos de cáncer (De Magalhães, 2013). La senescencia es un mecanismo supresor tumoral que limita el inicio de procesos carcinogénicos a través de mecanismos intrínsecos y extrínsecos a las células diana (Collado & Serrano, 2010; Kang et al., 2011). Sin embargo, existen evidencias de que a través del SASP, los tejidos envejecidos proporcionan un nicho de apoyo para las células tumorales (Coppé, Desprez, Krtolica, & Campisi, 2010). Las células senescentes pueden contribuir a la progresión del tumor al mejorar el potencial proliferativo de las células cancerosas (Krtolica, Parrinello, Lockett, Desprez, & Campisi, 2001) y al estimular procesos de transición epitelio mesénquima (Coppé et al., 2008). Por lo tanto, el acúmulo de células senescentes que se produce en los tejidos envejecidos, podría contribuir a la mayor incidencia de cáncer que se observa con la edad. Apoyando esto, se ha observado un inicio tardío en la formación de tumores en el riñón (Sturmlechner, Durik, Sieben, Baker, & Van Deursen, 2017) y una reducción en la incidencia de metástasis (Demaria, 2020) al eliminar de forma selectiva las células senescentes.

## OBJETIVOS III

## OBJETIVOS III

---

El cáncer es una patología fuertemente asociada al envejecimiento. La pérdida de la homeostasis que ocurre con el acúmulo de daños en los organismos a lo largo del tiempo, junto con la actividad paracrina que ejercen las células senescentes, tienen relevantes implicaciones en el desarrollo de tumores.

Dada la implicación de AhR en procesos inflamatorios y en progresión tumoral (Degner et al., 2009), así como las diferencias observadas en el estado de senescencia entre MEFs *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup>, hemos decidido abordar un posible papel de AhR en el desarrollo de procesos tumorales vinculados al envejecimiento y a la respuesta a senescencia. Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar los fenotipos de envejecimiento y de desarrollo de tumores en los animales envejecidos *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup>.
- Dilucidar la implicación de AhR en la senescencia celular.
- Analizar posibles diferencias en el contenido en células senescentes entre animales adultos y envejecidos *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup>.
- Estudiar el papel de AhR en el desarrollo de tumores hepáticos asociados a envejecimiento.

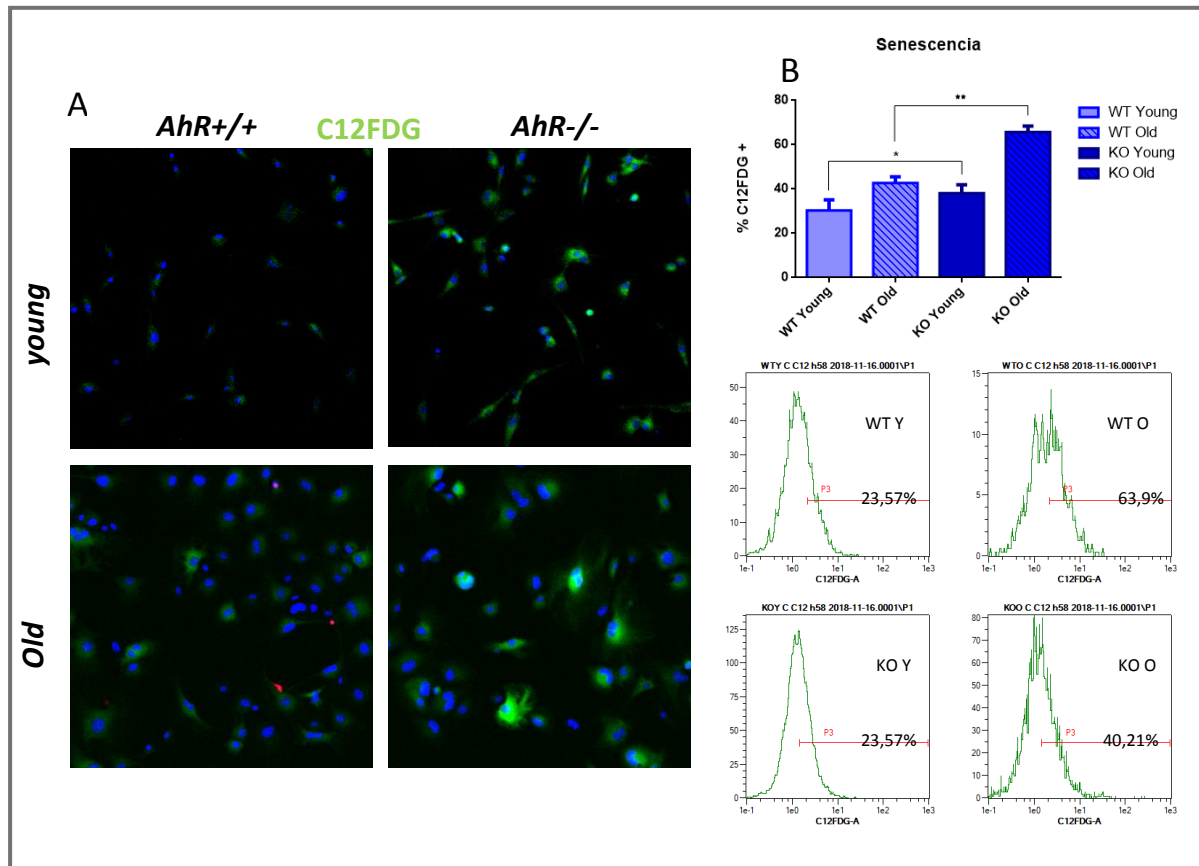
## RESULTADOS III

### 1. Los cultivos primarios de fibroblastos adultos procedentes de ratones *AhR*<sup>-/-</sup> mostraron un aumento en los niveles de senescencia

Con la finalidad de estudiar el papel de AhR en la respuesta celular a senescencia durante el envejecimiento, analizamos en primer lugar los niveles de senescencia en cultivos de fibroblastos adultos procedentes de la cola (*Tail Tips Fibroblasts*, TTFs) y la oreja de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup>. Los fibroblastos aislados de ratones de 6 semanas se utilizaron como condición joven (*young*) y se compararon con los cultivos realizados a partir de ratones de 15 a 24 meses (*old*) de ambos genotipos. Las células senescentes expresan la enzima  $\beta$ -galactosidasa lisosomal, cuya actividad a pH 6,0 se midió por tinción con el sustrato fluorescente 5-dodecanoilaminofluoresceína di- $\beta$ -D-galactopiranosido (C12FDG). El ensayo se basa en la hidrólisis de la molécula C12FDG por la  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia; tras la hidrólisis, el C12FDG emite fluorescencia a que puede detectarse tanto por microscopía de fluorescencia como por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo se muestran en la **Figura RIII.1**. El envejecimiento provocó un aumento en los niveles de células senescentes en los cultivos de ambos genotipos. Sin embargo, los fibroblastos procedentes de ratones carentes de AhR mostraron unas tasas de senescencia significativamente más elevadas que los fibroblastos silvestres. Más aún, los fibroblastos *AhR*<sup>-/-</sup> obtenidos de ratones jóvenes ya presentaron niveles más elevados de senescencia que los de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> de la misma edad (**Figura RIII.1**), lo cual indica que la ausencia de este receptor favorece la respuesta celular de senescencia.

**Estos resultados sugieren que AhR está implicado en la senescencia celular y que su ausencia en ratones provoca un aumento en la respuesta senescente, más acusada en células adultas pero apreciable incluso en células jóvenes.**

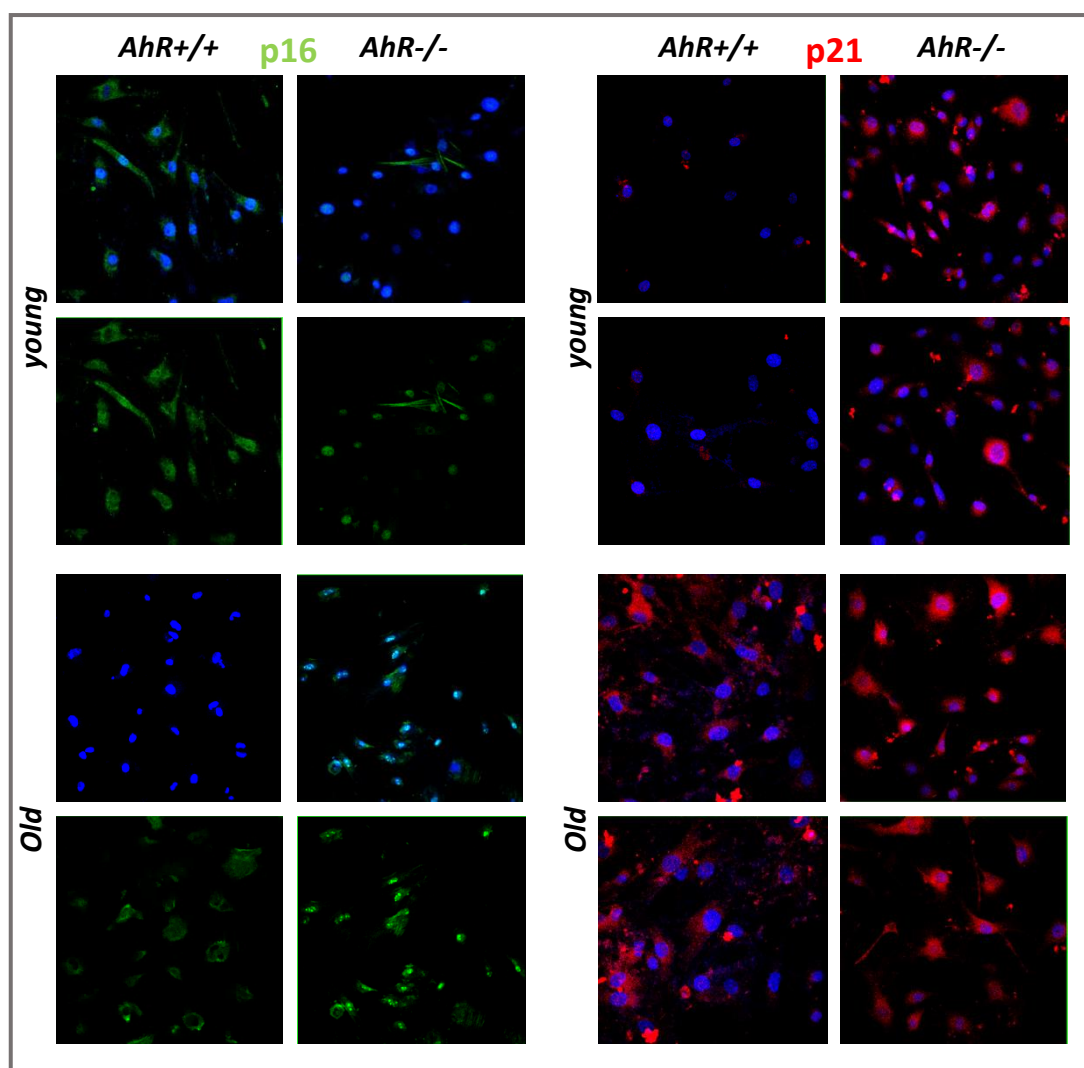


**Figura RIII.1. Los TTFs *AhR*<sup>-/-</sup> muestran mayor tasa de senescencia.** Fibroblastos procedentes de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> fueron teñidos con el reactivo C12FDG para analizar la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. **A)** mediante el microscopio confocal Olympus FV1000 con el software FV10 (Olympus) analizamos la fluorescencia del sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa. **B)** Cuantificamos el porcentaje de células fluorescentes mediante citometría de flujo.

Con la intención de profundizar en el mecanismo que provoca esta respuesta diferencial entre fibroblastos adultos *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup>, nos dispusimos a estudiar la expresión de los inhibidores de ciclo celular p16<sup>INK4A</sup> y p21, ambos implicados en la respuesta a senescencia (Figura RIII.2). Mediante inmunofluorescencia, pudimos observar cómo los fibroblastos *AhR*<sup>-/-</sup> procedentes de animales jóvenes presentaron sobreexpresión de p21 que se mantuvo en los animales envejecidos. Por el contrario, en los fibroblastos *AhR*<sup>+/+</sup> el aumento de expresión de p21 únicamente tuvo lugar con el envejecimiento. Curiosamente, observamos una localización diferente de p16<sup>INK4A</sup> en función de la presencia de AhR. Esta proteína se ubicó en el núcleo de fibroblastos jóvenes

*AhR*<sup>-/-</sup>, mientras que apareció fuera del núcleo en los equivalentes de ratones *AhR*<sup>+/+</sup>. En fibroblastos de ratones envejecidos, observamos tinción nuclear de p16<sup>INK4A</sup> en ambos genotipos, siendo esta de mayor intensidad en los *AhR*<sup>-/-</sup>, en los que por otro lado apareció localizada en focos discretos (Figura RIII.2).

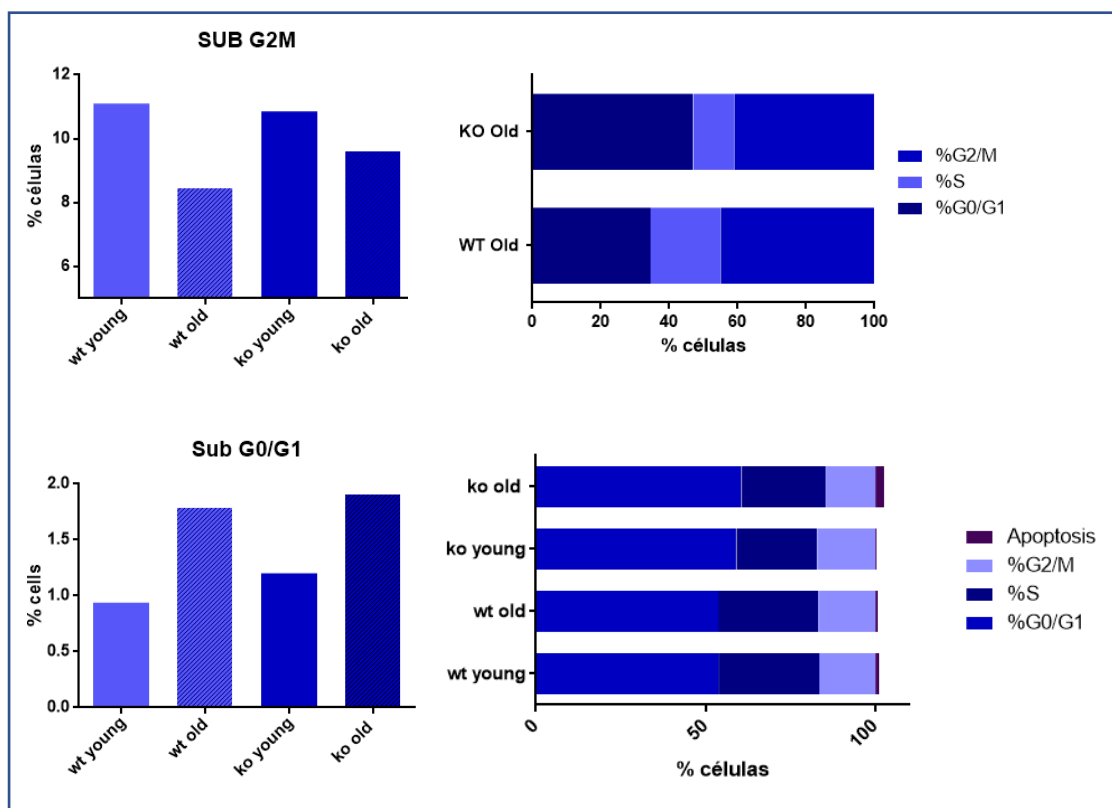
Estos resultados indican que los fibroblastos carentes de AhR podrían estar activando la respuesta a senescencia de forma prematura mediante un incremento en la expresión de inhibidores de ciclo.



**Figura RIII.2.** En ausencia de AhR se sobreexpresa p21 y p16 se localiza en el núcleo. Las proteínas p16 y p21 se analizaron en TTFs *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos. DAPI se utilizó para la tinción de los núcleos. Se obtuvieron imágenes mediante microscopio confocal Olympus FV1000 con el software FV10 (Olympus)

## 2. Los fibroblastos de la cola (TTFs) *AhR*<sup>-/-</sup> mantuvieron mayores tasas de quiescencia celular y de daño genómico

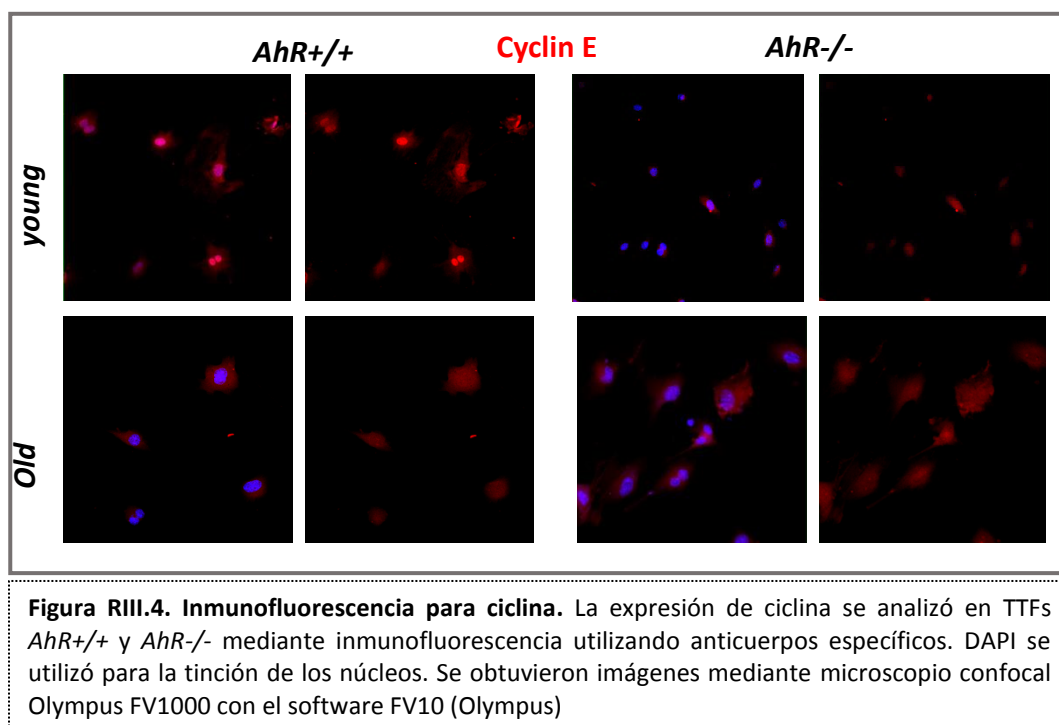
Tras analizar la expresión diferencial de los inhibidores de ciclo, así como los cambios en actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia, nos planteamos estudiar la progresión del ciclo celular en los TTFs *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> mediante citometría de flujo. En la Figura RIII.3 se muestra como el envejecimiento provocó en ambos genotipos un aumento en el porcentaje de células en la fase sub G0/G1, lo que es indicativo de que la progresión del ciclo celular se vio limitada en TTFs de animales envejecidos. Al comparar cultivos de ratones envejecidos a pase 3, observamos como en ausencia de AhR se redujo notablemente la proporción de células en fase S con el aumento consiguiente en G0/G1, denotando una más efectiva parada del ciclo celular. Las células *AhR*<sup>-/-</sup> mostraron además una tasa más elevada de apoptosis y un porcentaje en G2/M superior, concordante con el incremento de ploidía característico de las células senescentes (Figura RIII.3).



**Figura RIII.3. La ausencia de AhR provoca un aumento de G0/G1.** Los fibroblastos embrionarios fueron analizados para la proporción del ciclo celular mediante citometría de flujo. Se indica el porcentaje de células en cada una de las fases.



La expresión de ciclina fue analizada por inmunofluorescencia, observándose una expresión nuclear disminuida en fibroblastos envejecidos de ambos genotipos (Figura RIII.4). En ausencia de AhR, las células TTF presentaron menores niveles de ciclina nuclear, efecto que se observó incluso en las de animales jóvenes. A continuación, nos planteamos si la inhibición del ciclo celular en ausencia de AhR podría estar asociada a un mayor daño genómico. Para abordar esta cuestión, llevamos a cabo inmunofluorescencias para el marcador de daño celular histona H2AX<sub>y</sub>. En la Figura RIII.5 se muestra que los focos de esta histona se formaron con mayor frecuencia en los fibroblastos envejecidos *AhR*<sup>-/-</sup> que en los *AhR*<sup>+/+</sup>.

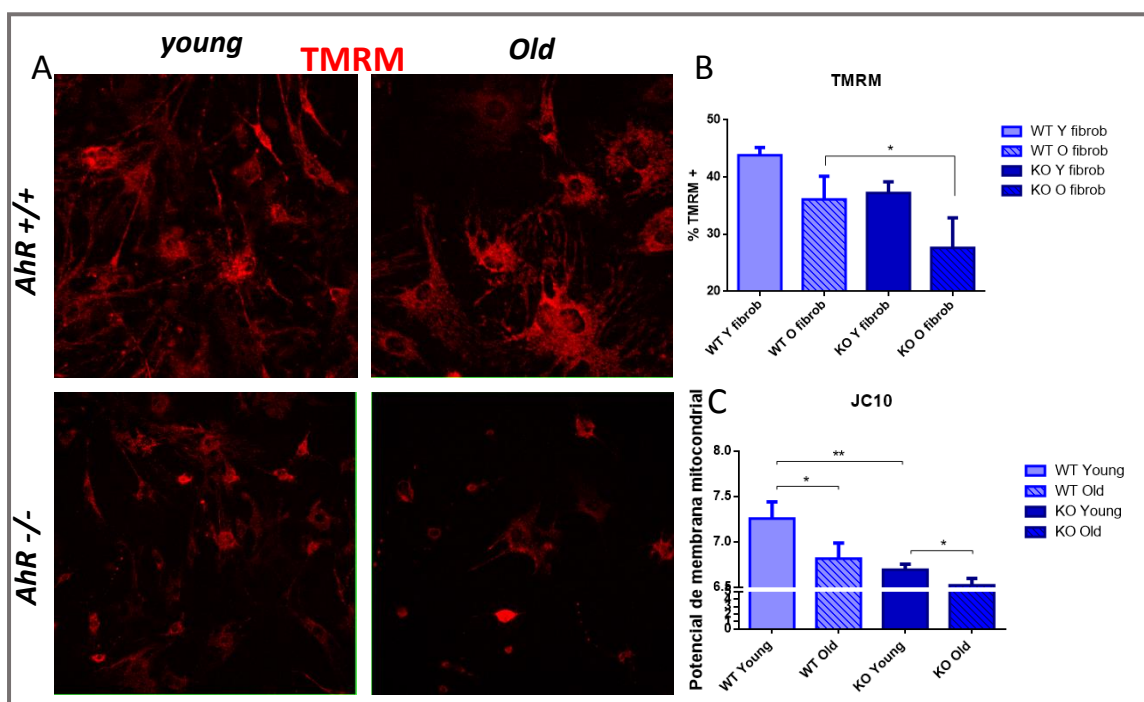


Los TTFs *AhR*<sup>-/-</sup> presentaron un incremento de la quiescencia celular probablemente asociado a un mayor nivel de daño genómico.

### 3. La ausencia de AhR generó disfunción mitocondrial en TTFs.

La disfunción mitocondrial es una característica típica del proceso de envejecimiento celular. Para analizar si la actividad mitocondrial de fibroblastos adultos de ratón TTF estuvo sujeta a la presencia de AhR, analizamos el potencial de membrana mitocondrial mediante tinción con TMRM (*Tetramethylrhodamine*). Esta sonda catiónica fluorescente se acumula en la matriz de las mitocondrias que presentan una fuerte carga negativa en su interior. Las células fueron teñidas con TMRM y analizadas mediante citometría de flujo (Figura RIII.6). Los resultados mostraron una disminución en la actividad mitocondrial en ambos genotipos con el envejecimiento. Sorprendentemente, las células de animales jóvenes carentes de AhR mostraron una actividad mitocondrial mucho menor en comparación con la de los animales silvestres de la misma edad. Para corroborar este resultado, llevamos a cabo un segundo análisis con la sonda fluorescente JC-10. Esta sonda se concentra en la matriz de mitocondrias activas formando agregados fluorescentes rojos, pero cuando difunde fuera de la mitocondria pasa a forma monomérica emitiendo fluorescencia verde; el cociente entre fluorescencias permite calcular el potencial de membrana. En la Figura RIII.6 se muestra como la disfunción mitocondrial estuvo presente en ambos genotipos, existiendo una disminución significativa del potencial de membrana mitocondrial tanto en TTFs *AhR*<sup>+/+</sup> como *AhR*<sup>-/-</sup>. Sin embargo, el potencial de membrana mitocondrial fue significativamente menor en los fibroblastos de ratones *AhR*<sup>-/-</sup> jóvenes.

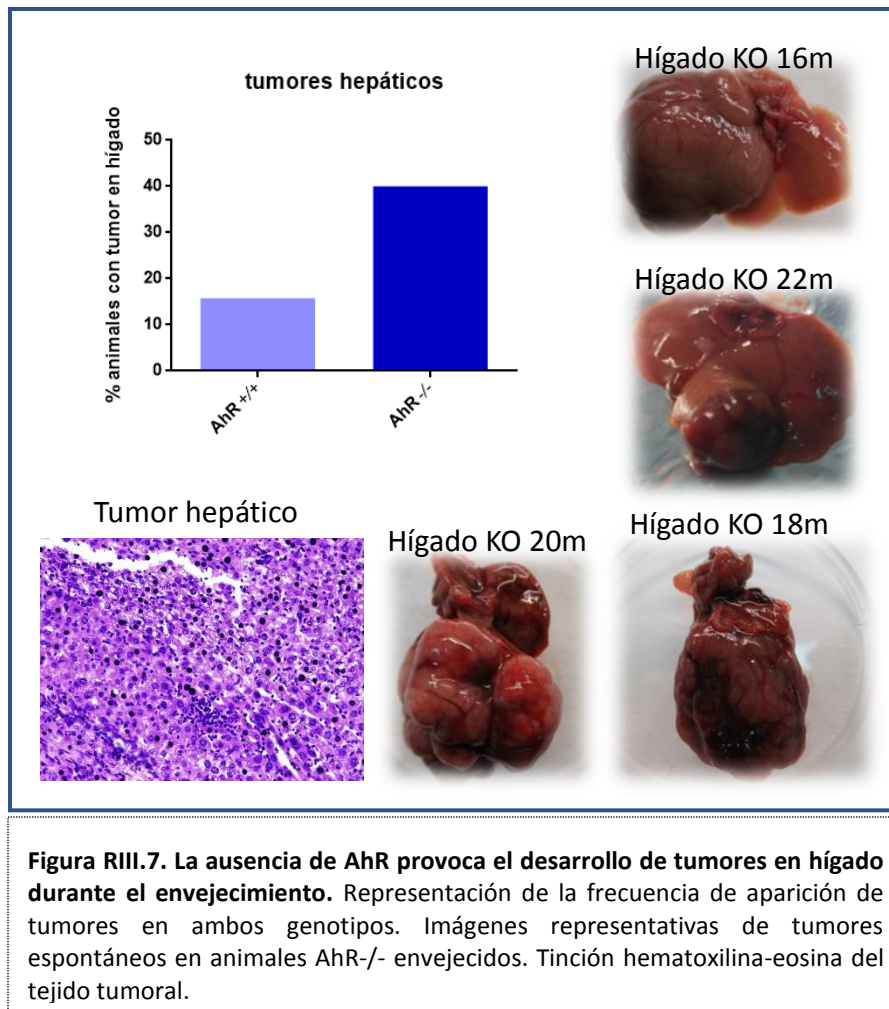
**Estos resultados indican que la ausencia de AhR provocó una disfunción mitocondrial temprana en fibroblastos TTF de animales adultos jóvenes.**



**Figura RIII.6. En ausencia de AhR los TTFs exhiben disfunción mitocondrial.** Fibroblastos procedentes de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> fueron teñidos con TMRM para analizar la mitocondrial. A) mediante el microscopio confocal Olympus FV1000 con el software FV10 (Olympus) analizamos la fluorescencia emitida por el TMRM B) Cuantificamos el porcentaje de células fluorescentes TMRM positivas mediante citometría de flujo. C) cuantificamos el potencial de membrana mitocondrial mediante la sonda JC10.

#### 4. Los animales *AhR*<sup>-/-</sup> desarrollaron tumores hepáticos espontáneos durante el proceso de envejecimiento

Con la finalidad de analizar la implicación de AhR en el proceso de envejecimiento, realizamos necropsias de animales *AhR*<sup>-/-</sup> desde los 15 hasta los 24 meses de edad, comparándolas con las de animales *AhR*<sup>+/+</sup> de igual edad. Las biopsias fueron tomadas de tejidos representativos y analizadas macroscópica e histológicamente. Uno de los resultados más relevantes fue el de encontrar que los animales que carecen de AhR desarrollaron tumores hepáticos espontáneos durante el envejecimiento con una incidencia casi un 30% superior a la de los ratones silvestres (Figura RIII.7).

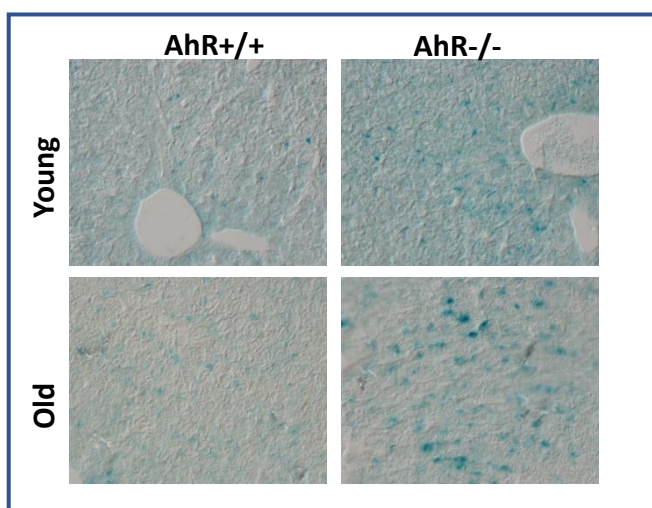


Mediante evaluación histológica con tinción de hematoxilina-eosina, observamos que este tejido hepático tumoral presentaba núcleos picnóticos y condensación de la cromatina, ambos cambios fenotípicos que ocurren en células postreplicativas y que son característicos de células senescentes (Madeira-Coelho, 1988).

**La depleción de AhR hace que el tejido hepático sea más susceptible al desarrollo de patologías hiperplásicas asociadas al envejecimiento.**

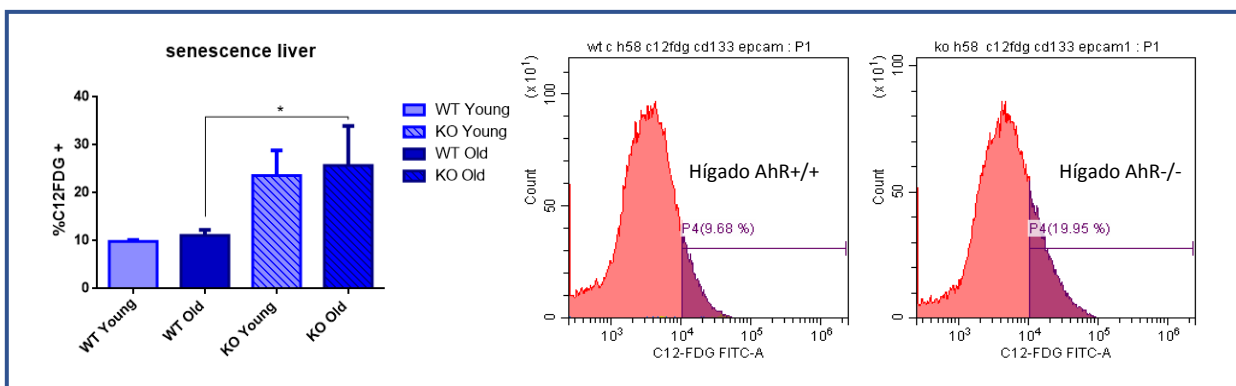
## 5. La ausencia de AhR causó un aumento en el contenido de células senescentes en hígado

Conociendo el vínculo existente entre la senescencia y el desarrollo de cáncer durante el envejecimiento, y la implicación de AhR en senescencia en cultivos primarios, decidimos abordar la posibilidad de que la presencia de AhR influyera en el contenido de células senescentes en el hígado. En primer lugar, llevamos a cabo un análisis de actividad de la enzima asociada a senescencia  $\beta$ -galactosidasa mediante tinción de criosecciones hepáticas con el sustrato X-gal (Figura RIII.8). La tinción obtenida en las criosecciones reveló un mayor contenido en células senescentes en el hígado *AhR*<sup>-/-</sup> que en el *AhR*<sup>+/+</sup>.



**Figura RIII.8. El hígado *AhR*<sup>-/-</sup> muestra mayor nivel de senescencia.** Imágenes representativas de tinción de  $\beta$ -galactosidasa en secciones de hígado procedente de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> jóvenes o envejecidos.

Para confirmar este resultado, llevamos a cabo un estudio de la actividad  $\beta$ -galactosidasa por citometría de flujo utilizando el sustrato fluorescente C12FDG (Figura RIII.9). Tras la tinción de la suspensión celular hepática con el sustrato fluorescente, el análisis por citometría reveló que los niveles de este marcador de senescencia aumentaron con el envejecimiento en ambos genotipos, y que los hígados de animales *AhR*<sup>-/-</sup> presentaron un mayor aumento de la actividad de esta enzima, indicando la existencia de una población mayor de células senescentes en el hígado de animales carentes de AhR (Figura RIII.9).



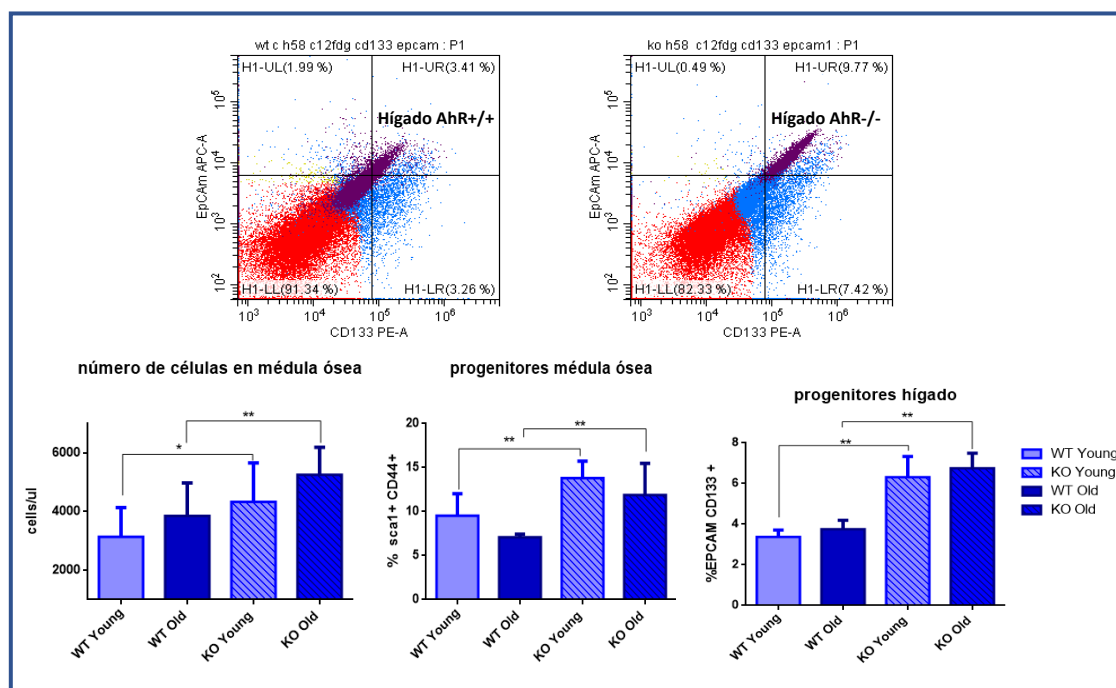
**Figura RIII.9. Los niveles de senescencia en células hepáticas aumentan en ausencia de AhR.** Análisis de los niveles de senescencia en hígado procedente de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> mediante tinción con el sustrato de  $\beta$ -galactosidasa C12FDG y análisis en citómetro de flujo Cytomics FC-500 (Beckman-Coulter)

En animales *AhR*<sup>-/-</sup> se produjo una mayor acumulación de células senescentes en el tejido hepático durante el envejecimiento.

#### 6. Los ratones carentes de AhR presentaron un mayor contenido en células progenitoras en hígado y médula ósea durante el envejecimiento.

En estudios anteriores, hemos demostrado que la ausencia de expresión de AhR causa un fenotipo indiferenciado en los tejidos de ratones adultos, lo cual origina una ventaja regenerativa estando también fuertemente relacionada con el desarrollo de tumores.(M. Contador-Troca et al., 2013; María Contador-Troca et al., 2015) En este estudio, analizamos el contenido de células progenitoras en el hígado en animales jóvenes y envejecidos de ambos genotipos usando los marcadores CD133 y Epcam por citometría de flujo. Tras la cuantificación de dichas poblaciones, obtuvimos que los hígados de los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> presentaron un porcentaje superior de células indiferenciadas (Figura RIII.10), sugiriendo que los ratones carentes de AhR mantienen una menor diferenciación hepática a lo largo del envejecimiento. Para comprobar si este hallazgo era extrapolable a

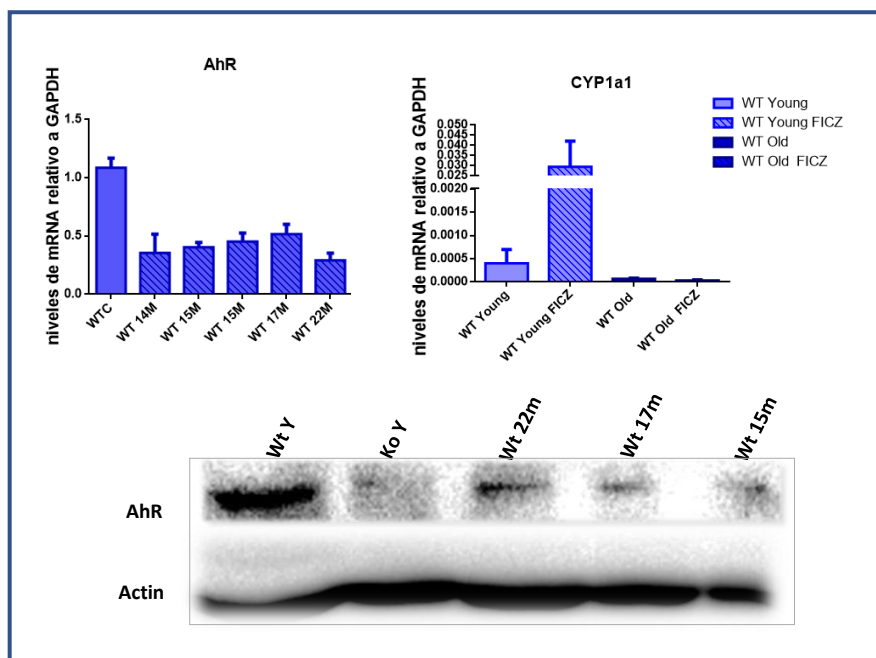
otros tejidos, analizamos el contenido en células progenitoras de médula ósea, ya que su pérdida está fuertemente vinculada al envejecimiento. Mediante citometría de flujo cuantificamos el número total de células de médula ósea aisladas del fémur completo de animales *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> (Figura RIII.10). Los resultados obtenidos mostraron que existe una mayor celularidad en la médula ósea de animales jóvenes *AhR*<sup>-/-</sup>, y dicha propiedad se mantuvo durante el envejecimiento. Con el fin de cuantificar las células progenitoras, medimos los marcadores Sca1 y CD44 y, como se muestra en la Figura RIII.10, los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> mostraron niveles superiores de esta población de células indiferenciadas con respecto a los *AhR*<sup>+/+</sup>, ya sean jóvenes o envejecidos.



**Figura RIII.10. Los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> presentan un mayor porcentaje de células progenitoras en hígado y médula ósea.** Cuantificación de la población de progenitores en hígado procedente de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> mediante análisis de los marcadores EPCAM y CD133 en citómetro de flujo Cytomics FC-500 (Beckman-Coulter)

**7. La población de células indiferenciadas en hígado y médula ósea fue superior en ausencia de AhR, incluso durante el envejecimiento. La expresión de AhR disminuyó durante el proceso de envejecimiento**

Con el fin de dilucidar el papel de AhR en el envejecimiento del hígado, y su posible vínculo con el desarrollo de tumores, analizamos su expresión en tejido hepático a lo largo del envejecimiento (Figura RIII.11). Mediante RT-qPCR pudimos apreciar un descenso en los niveles hepáticos del mRNA de AhR en ratones de 15 o más meses comparado con ratones jóvenes de 6 semanas de edad. Esta disminución en los niveles transcripcionales de AhR fue comprobada a nivel de proteína mediante *immunoblotting* (Figura RIII.11). Además, analizamos la actividad de AhR como factor de transcripción inyectando *in vivo* el agonista FICZ y verificando posteriormente la expresión del gen diana *Cyp1a1*. Los resultados mostraron que en ratones envejecidos de 17-22 meses, AhR perdió la capacidad de inducir la expresión de su gen diana tras activación por ligando.



**Figura RIII.11. AhR se expresa en menor nivel en animales envejecidos.** RT-qPCR con *primers* específicos para AhR y CYP1a1. GAPDH se usó para normalizar la los niveles de expresión ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Inmunoblot con anticuerpo específico para analizar la expresión proteica de AhR.  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga

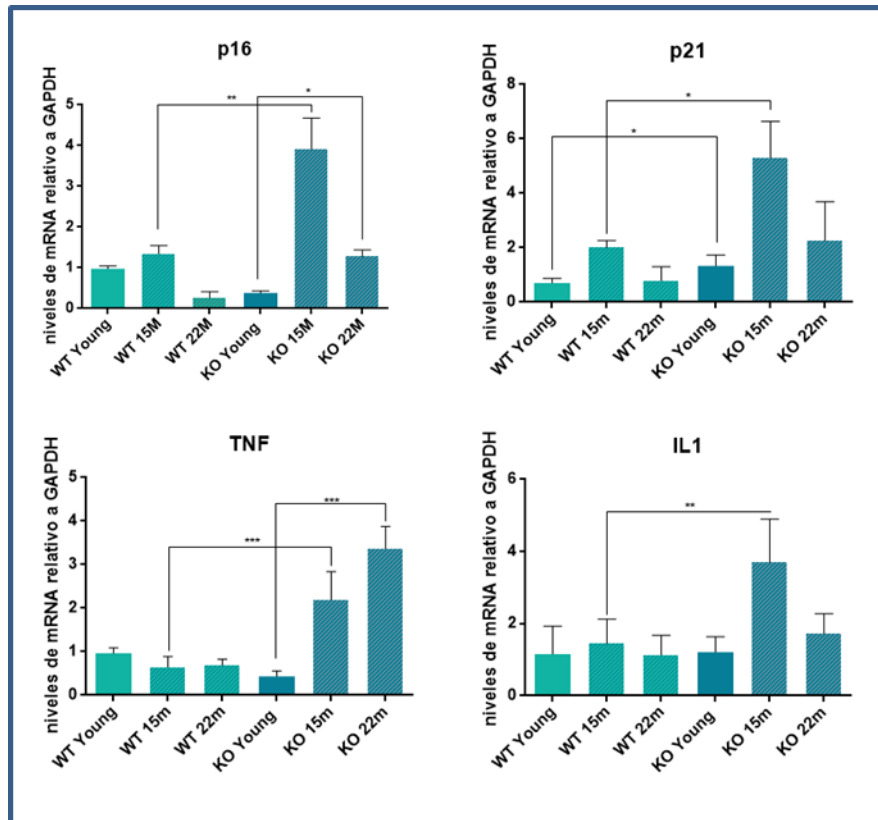


**Los resultados obtenidos indican que la expresión de AhR disminuyó durante el proceso de envejecimiento en hígado.**

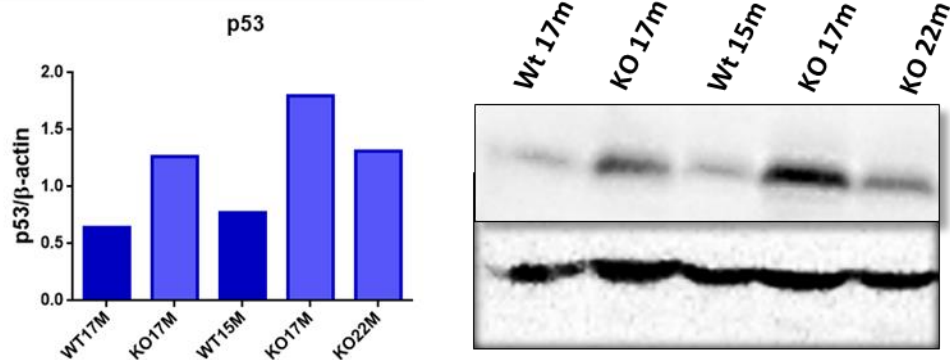
#### **8. En ausencia de AhR se incrementaron los niveles hepáticos de marcadores de senescencia e inflamación**

Seguidamente, decidimos analizar la expresión de los marcadores de senescencia p16<sup>INK4A</sup> y p21 en el hígado de animales de 15 y 22 meses de edad de ambos genotipos, comparándolos con los niveles de expresión en ratones jóvenes (Figura RIII.12). Observamos que el aumento de expresión de estos marcadores con el envejecimiento fue significativamente mayor en los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> que en los *AhR*<sup>+/+</sup>. Adicionalmente, analizamos la expresión de genes implicados en el proceso inflamatorio desencadenado por las células senescentes y asociados al fenotipo SASP TNF e IL1 (Figura RIII.12). En concordancia con los niveles de senescencia, obtuvimos que estos marcadores se encontraron sobreexpresados en el hígado de ratones carentes del receptor en comparación con el hígado de ratones silvestres. Mediante *immunoblotting* analizamos también la expresión del supresor tumoral p53, cuya actividad es clave en el inicio y en el mantenimiento del estado senescente. Los resultados mostraron que los niveles proteicos de p53 fueron superiores en ratones *AhR*<sup>-/-</sup> (Figura RIII.13).

**El estado senescente más acusado en el hígado de ratones *AhR*<sup>-/-</sup> está asociado a un incremento en marcadores esenciales para dicho proceso.**



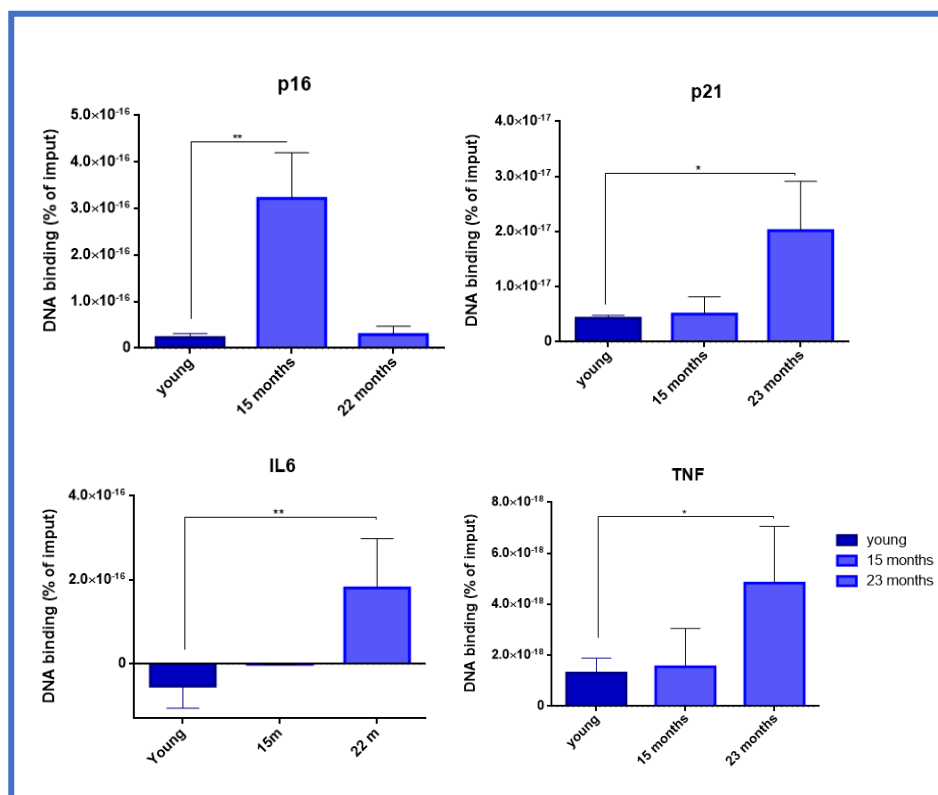
**Figura RIII.12. Los ratones AhR<sup>-/-</sup> sobreexpresan marcadores de senescencia y SASPs.** La expresión de p16, p21, TNF e IL1 fue determinada por RT-qPCR en hígado procedente de animales *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> de las edades indicadas. El nivel de expresión de GAPDH se utilizó para normalizar los niveles de expresión ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).



**Figura RIII.13. p53 está sobreexpresado en los ratones AhR<sup>-/-</sup>.** La expresión proteica de p53 fue determinada mediante western blot en extractos proteicos de hígado con un anticuerpo específico. La expresión de β-actina fue utilizada como control de carga.

## 9. AhR se une a los promotores de genes de senescencia y de factores del SASP

Basándonos en los resultados anteriores, presumimos que AhR podría ejercer una regulación directa de los genes de senescencia en condiciones fisiológicas, y que esta regulación podría verse alterada en ausencia del receptor. Para determinar si existe una regulación directa por parte de AhR de los genes que dirigen estos procesos, realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (*Chromatin Immunoprecipitation*, ChIP) y analizamos si AhR se une a las regiones reguladoras de estos genes con el fin de modular su expresión. En primer lugar, confirmamos la existencia de sitios XRE en los promotores de *p16*, *p21*, *TNF*, *IL6*, *IL1* y *p53* y analizamos mediante ChIP y qPCR la presencia de AhR en estas secuencias. El resultado mostró que AhR se une a las regiones promotoras de *IL1*, *IL6*, *TNF*, *p16* y *p21* durante el proceso de envejecimiento en hígado (Figura RIII.14).



**Figura RIII.14. AhR se une a regiones reguladoras de genes implicados en senescencia.** cuantificación del porcentaje de unión al DNA normalizados frente a un Input de DNA total. Como control negativo se utilizaron inmunoprecipitaciones sin anticuerpo (NoAb).

**AhR posee sitios de XRE de unión activos en los promotores de genes relevantes en senescencia y en la respuesta SASP**

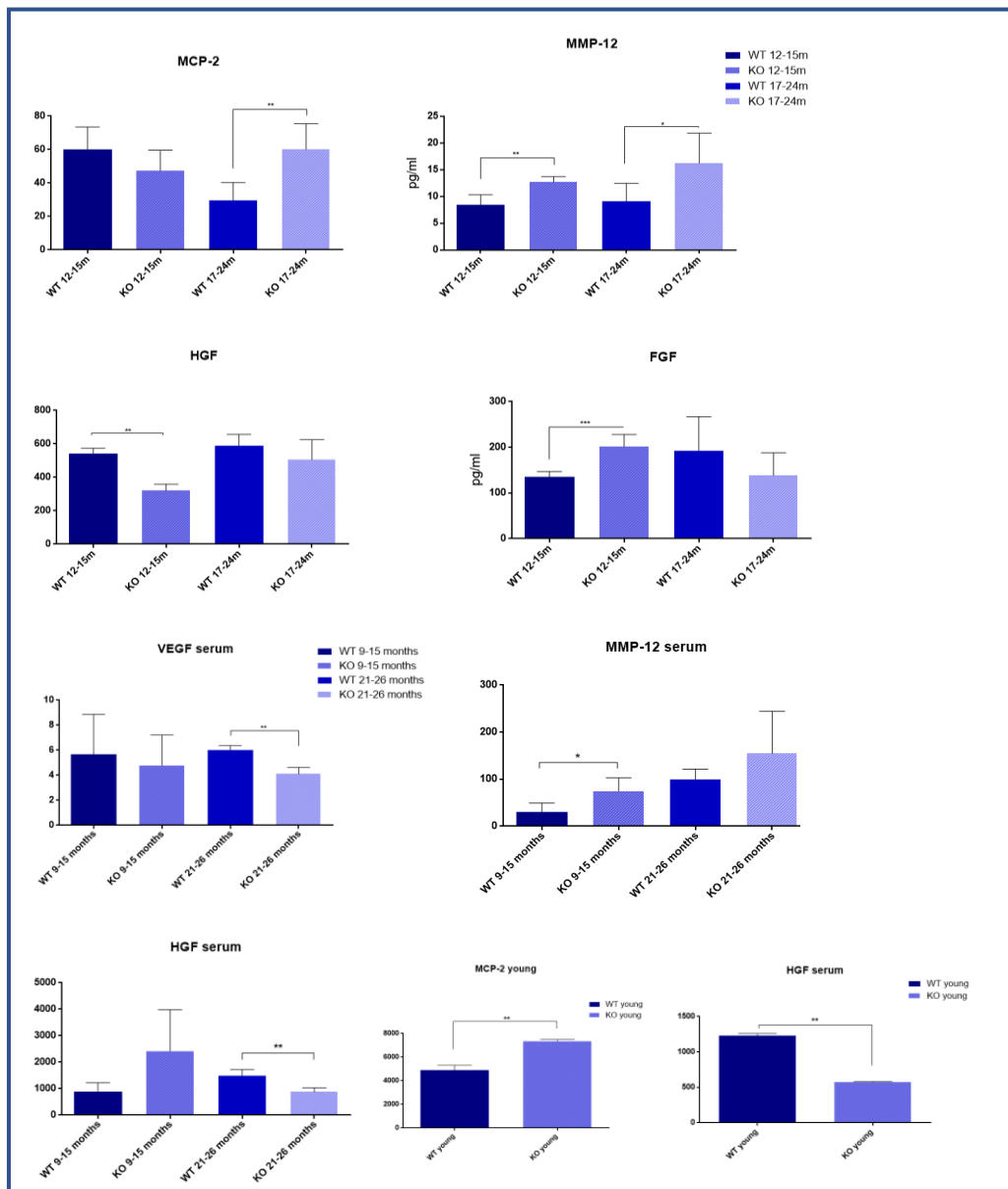
#### **10. La ausencia de AhR provocó un aumento en los niveles de varios factores del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP)**

Las células senescentes que se acumulan en los tejidos envejecidos contribuyen al desarrollo tumoral, en gran medida, debido a la secreción de ciertos factores que actúan sobre el microentorno tisular. Por ello, hemos llevado a cabo un análisis de los factores más relevantes asociados a SASPs en hígado de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> empleando la metodología *Multiplex Immunoassay*. Hemos analizado los niveles de interleuquinas y citoquinas tales como IL1, IL6 y CCL8/MCP2; los factores de crecimiento HGF, FGF y VEGF y la metaloproteasa de matriz extracelular MMP-12.

En extractos hepáticos, hemos observado diferencias significativas en los niveles de algunos de estos factores entre animales envejecidos *AhR*<sup>-/-</sup> y *AhR*<sup>+/+</sup> de la misma edad (Figura RIII.15). MCP-2 o CCL8 es una citoquina quimioatrayente para monocitos y macrófagos a zonas de trauma, infección y progresión tumoral. En el hígado de animales envejecidos *AhR*<sup>-/-</sup> (17-24 meses de edad), esta citoquina se expresó a un nivel significativamente superior al de los animales *AhR*<sup>+/+</sup>. Otros factores característicos del SASPs se encontraron igualmente en mayor nivel en el hígado de animales carentes del receptor. Así sucedió con el factor de crecimiento fibroblástico (**Fibroblast Growth Factor**) FGF y con la metaloproteasa de matriz extracelular MMP-12, los cuales también presentaron niveles superiores en animales *AhR*<sup>-/-</sup> jóvenes (Figura RIII.15).

Por su parte, el factor de crecimiento endotelial vascular (**Vascular Endothelial Growth Factor**) VEGF y el factor de hepatocitos (**Hepatocyte Growth Factor**) HGF, se encontraron en menores niveles en animales envejecidos *AhR*<sup>-/-</sup>. (Roman et al., 2009)

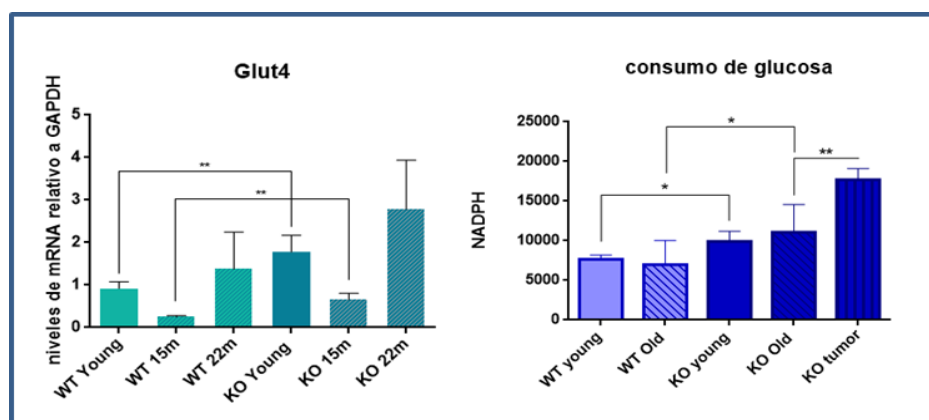
**Estos resultados indican que AhR puede participar en la secreción de ciertos factores del fenotipo secretor asociado a senescencia.**



**Figura RIII.15. AhR influye en la secreción de los factores del SASPs.** Representación de los niveles de citoquinas detectadas en homogeneizado hepático o suero sanguíneo porcedente de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> de las edades indicadas mediante *bioplex assay* representadas en en pg/ul.

## 11. Los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> presentaron un consumo de glucosa superior a nivel hepático

Desde el punto de vista metabólico, nos preguntamos si podría existir una desregulación del metabolismo de la glucosa que pudiera correlacionar con el proceso tumoral que tiene lugar en los animales carentes de AhR durante el envejecimiento. Para abordar esta cuestión, analizamos el consumo de glucosa en los hígados de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup>. En primer lugar, medimos mediante RT-qPCR la expresión del transportador de glucosa Glut4, encargado de transportar la glucosa al citoplasma de las células. Los resultados obtenidos indicaron que existía una sobreexpresión de Glut4 en ausencia de AhR. Para comprobar si este aumento en el transporte de glucosa implicaba su incorporación a la vía glicolítica, medimos la actividad hexoquinasa, enzima que cataliza el primer paso de la glicolisis fosforilando la glucosa a glucosa 6-fosfato. Mediante un ensayo de actividad enzimática, comprobamos que en el tejido hepático de animales *AhR*<sup>-/-</sup> el consumo de glucosa fue mayor que en el de ratones *AhR*<sup>+/+</sup>. Además, este aumento se vio notablemente acentuado cuando en el ensayo se empleó tejido procedente de los tumores hepáticos espontáneos aislados de ratones *AhR*<sup>-/-</sup> (Figura RIII.16).



**Figura RIII.16. Los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> presentan un aumento de la glucólisis a nivel hepático.** La expresión de glut4 se midió en tejido hepático mediante RT-qPCR con oligonucleótidos específicos, el nivel de expresión de GAPDH se utilizó para normalizar los niveles de expresión ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). El consumo de glucosa se analizó en hígado procedente de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> de las edades indicadas mediante el kit de actividad enzimática Biovision

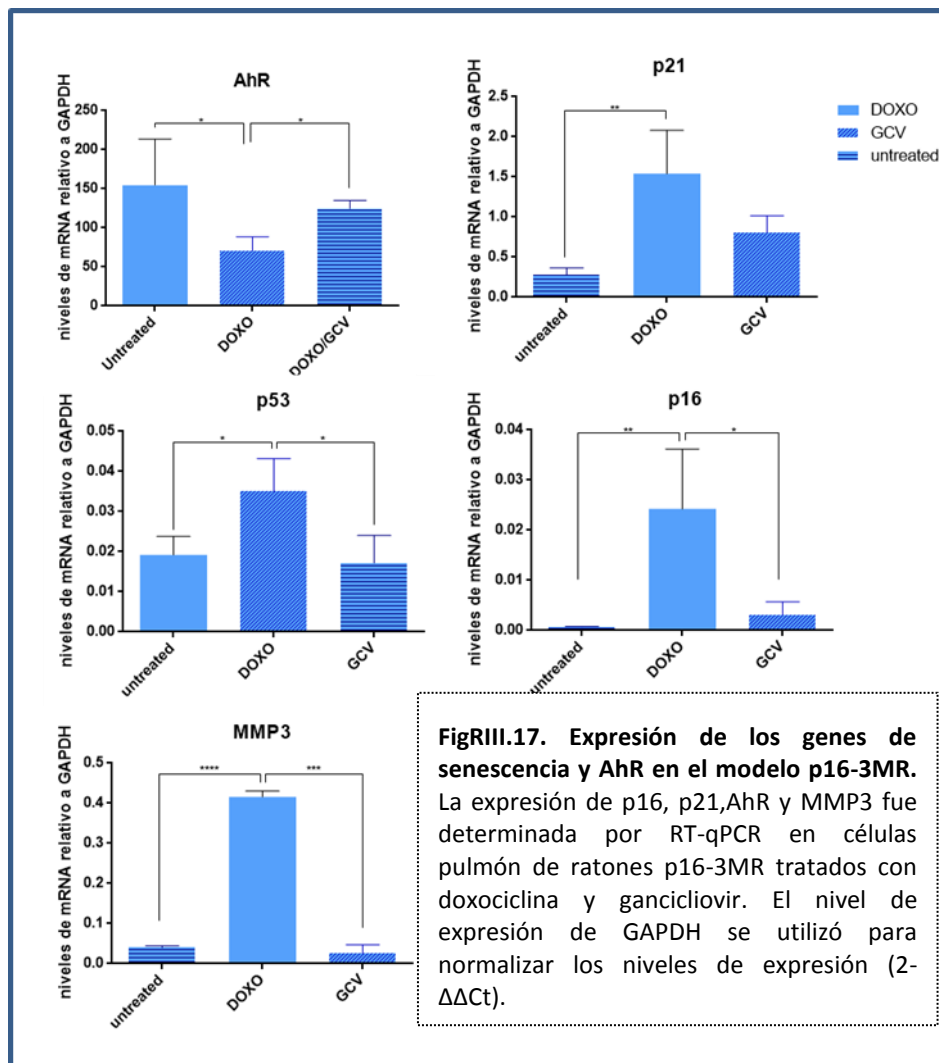
**La ausencia de AhR promovió el metabolismo glucolítico en hígado durante el envejecimiento y el desarrollo tumoral**

## **12. La eliminación de células senescentes redujo los niveles de AhR**

Para estudiar si AhR se encuentra sujeto a regulación dependiente de senescencia en otros tejidos, analizamos su expresión en el pulmón de ratones transgénicos p16-3MR, en los cuales se puede llevar a cabo la eliminación selectiva de células senescentes p16/Ink4a positivas por acción del fármaco ganciclovir (GCV).

En este estudio, diseñamos diferentes condiciones experimentales: (1) analizamos los niveles de expresión de marcadores de senescencia en tejido procedente de animales tratados con doxorubicina (DOXO); (2) tratados con doxorubicina y ganciclovir (GCV) para la eliminación de células senescentes; y (3) sin tratamiento como controles en estado basal. Los resultados obtenidos (Figura RIII.17), mostraron que la inducción de senescencia con DOXO redujo los niveles de AhR y, concomitantemente, incrementó los marcadores de senescencia *p16<sup>INK4A</sup>*, *p21*, *MMP3* y *p53*. La expresión de estos genes reverteió a niveles basales tras la eliminación de las células senescentes por cotratamiento con DOXO+GCV. Interesantemente, la eliminación de las células senescentes restableció la expresión de AhR en este modelo murino.

**La inducción de senescencia disminuyó los niveles de AhR en pulmón de ratones p16-3MR y concomitantemente incrementó la expresión de los marcadores de senescencia *p16<sup>INK4A</sup>*, *p21*, *p53* y *MMP3***



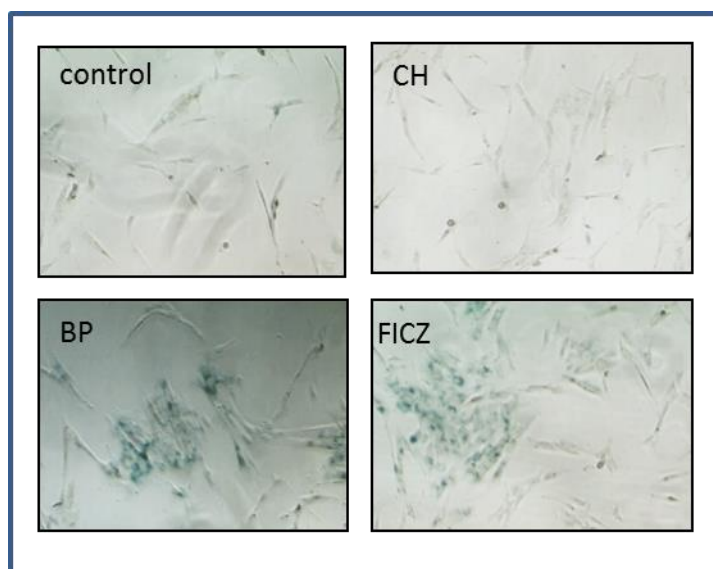
### 13. La modulación farmacológica de AhR alteró la tasa de senescencia en fibroblastos humanos

Tras corroborar la existencia de un importante vínculo entre el receptor AhR y la respuesta celular de senescencia en ratón, decidimos analizar si la modulación farmacológica de los niveles de AhR podría afectar la respuesta a senescencia en fibroblastos humanos IMR90 (Figura RIII.18). En primer lugar, llevamos a cabo una tinción con X-gal para estudiar la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las células IMR-90 tras el

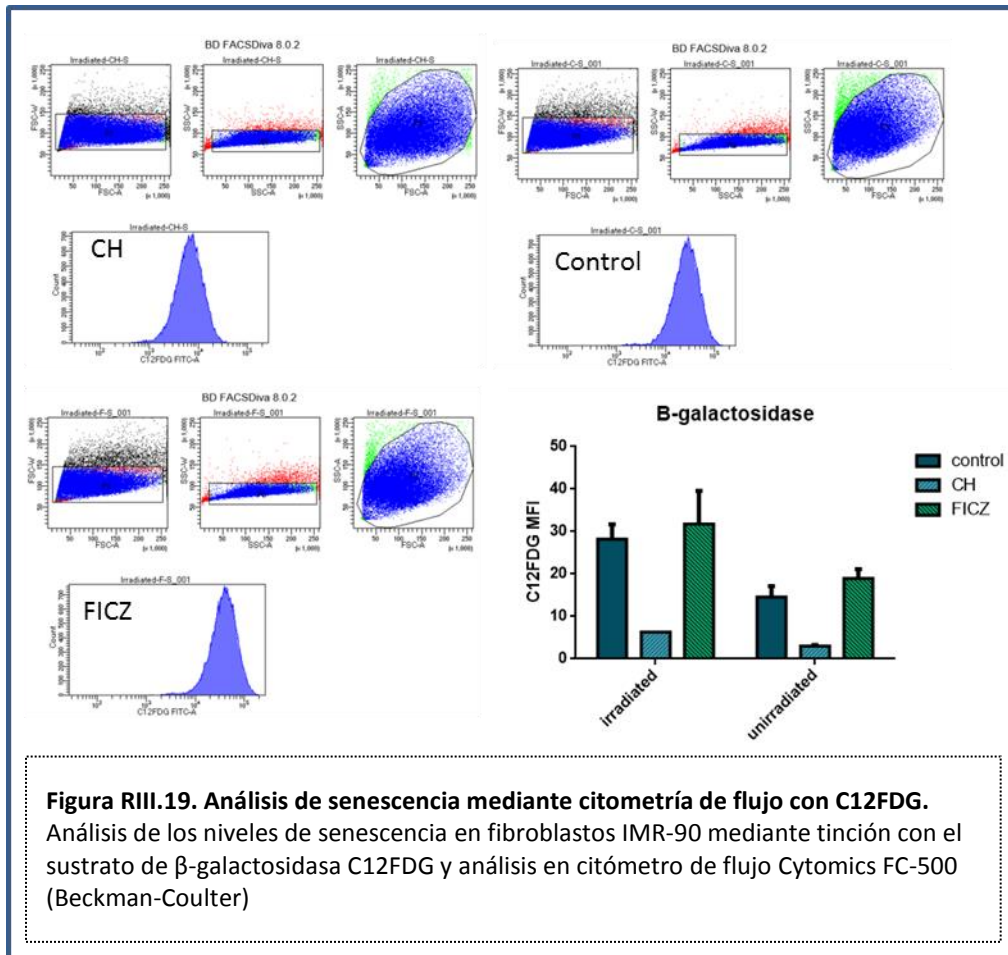


tratamiento con agonistas y antagonistas del receptor. Los resultados obtenidos indicaron que el tratamiento con el agonista fisiológico y no tóxico de AhR FICZ (6-formilindol(3,2-b)carbazol) aumentó la respuesta a senescencia de estas células mientras que el tratamiento con el antagonista CH223191 no dio lugar a una reducción apreciable de la senescencia. El ligando prototipo de AhR BaP produjo un efecto similar al ligando fisiológico FICZ (Figura RIII.18).

A continuación, irradiamos las células IMR90 y analizamos mediante citometría de flujo la actividad la  $\beta$ -galactosidasa en presencia de dichos agonistas y antagonistas. Los resultados obtenidos (Figura RIII.19), mostraron que la irradiación de las células activó la respuesta senescente medida por la fluorescencia de C12FDG, y que dicha respuesta se incrementó cuando las células fueron tratadas con los agonistas de AhR BaP y FICZ. El tratamiento con el antagonista CH-223191 disminuyó la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Por otro lado, el efecto de los agonistas y antagonistas de AhR sobre la actividad  $\beta$ -galactosidasa en ausencia de irradiación, siguió un patrón similar al observado para las células IMR90 irradiadas. (Figura RIII.19).

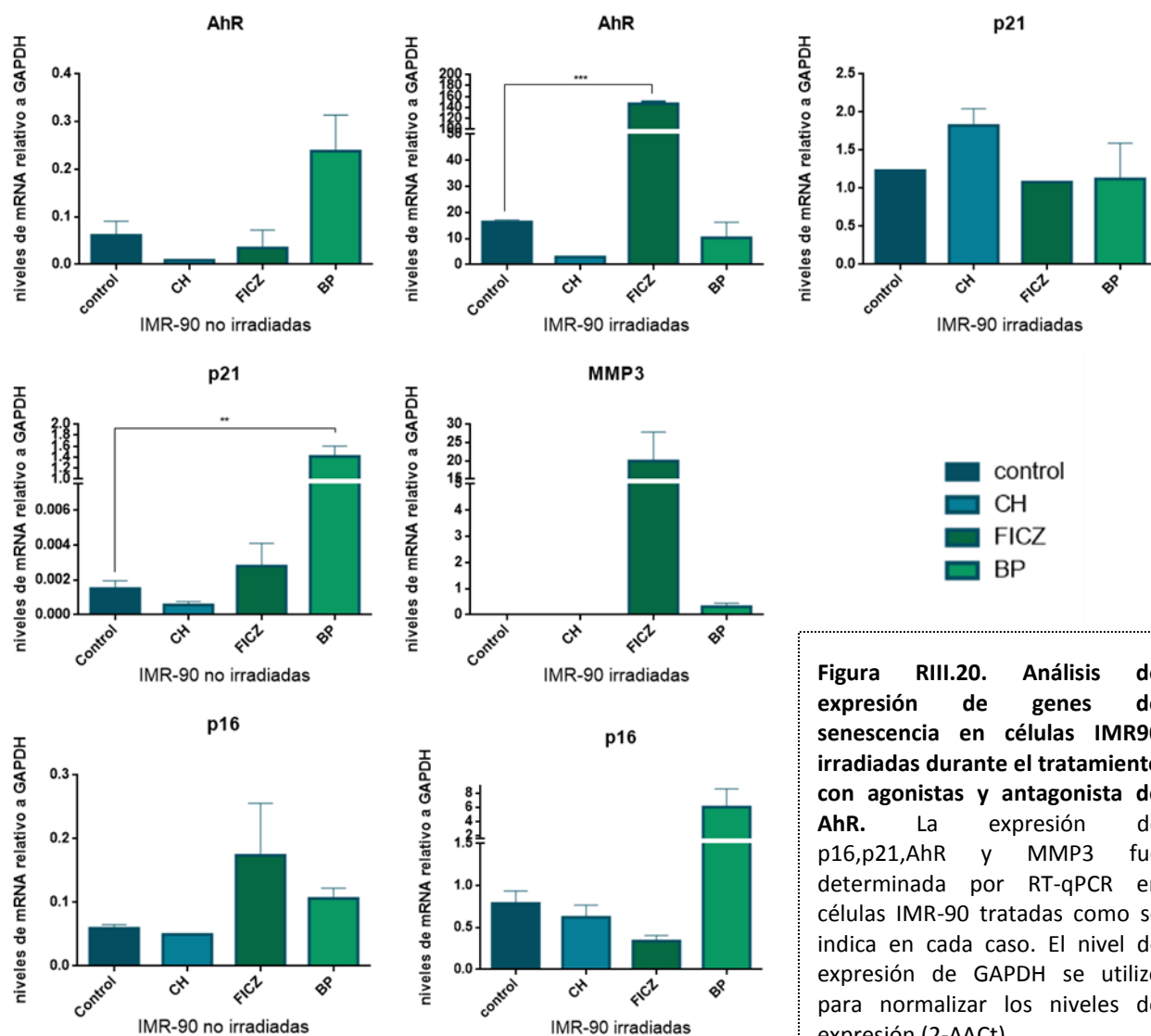


**Figura RIII.18. Tinción de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en células IMR90 tratadas con moduladores de AhR.** Fibroblastos IMR-90 tratados con CH-223, benzo-a-pireno y FICZ fueron fijados y teñidos mediante el *senescence  $\beta$ -galactosidase staining Kit* para la detección de actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.



Seguidamente, analizamos el efecto de los agonistas y antagonistas de AhR sobre la expresión de los genes de senescencia en células IMR90 irradiadas. El tratamiento con el agonista fisiológico FICZ provocó un aumento en la expresión del marcador MMP3 que tuvo lugar conjuntamente con un aumento en la expresión de AhR.  $p16^{\text{INK4A}}$  experimentó un ligero aumento tras el tratamiento con BaP, mientras que no se observaron cambios significativos en la expresión de p21. En células IMR90 no irradiadas, el tratamiento con BaP provocó un incremento significativo en los niveles de p21, mientras que no se produjeron cambios significativos en la expresión de  $p16^{\text{INK4A}}$  (Figura RIII.20).

Estos resultados indican que el nivel de activación de AhR puede modular la respuesta celular a la senescencia.



**Figura RIII.20. Análisis de expresión de genes de senescencia en células IMR90 irradiadas durante el tratamiento con agonistas y antagonista de AhR.** La expresión de p16,p21,AhR y MMP3 fue determinada por RT-qPCR en células IMR-90 tratadas como se indica en cada caso. El nivel de expresión de GAPDH se utilizó para normalizar los niveles de expresión ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

## DISCUSIÓN III

En este tercer capítulo hemos abordado el papel de AhR en la senescencia celular. Las células activan la respuesta a estrés denominada senescencia cuando presentan daños que suponen un riesgo para el organismo, como puede ser el inicio de un proceso potencialmente oncogénico. Esta pérdida de homeostasis y la adquisición de inestabilidad genómica aumentan a medida que avanza el envejecimiento, con el consiguiente deterioro de las funciones celulares.

Hemos comprobado que los fibroblastos de la cola (TTFs) de ratones envejecidos (15 a 22 meses) activan una respuesta senescente con una eficiencia significativamente mayor que la de los fibroblastos de ratones jóvenes (4-6 semanas). Este efecto tuvo lugar en TTFs tanto de animales *AhR*<sup>+/+</sup> como *AhR*<sup>-/-</sup>. Interesantemente, estos experimentos arrojaron como resultado que la carencia de AhR aumentó notablemente los niveles de senescencia en estos cultivos de fibroblastos primarios procedentes de ratones adultos, tal como se determinó analizando marcadores clásicos del proceso tales como la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa y los inhibidores de ciclo p16<sup>INK4A</sup> y p21. Mediante inmunocitofluorescencia hemos observado una clara diferencia en la localización del inhibidor p16<sup>INK4A</sup>, detectándose en mayores niveles en el núcleo de TTFs *AhR*<sup>-/-</sup>, lo que sugiere que en dichas células se encuentra en su estado funcionalmente activo. El análisis de la progresión del ciclo celular, ha mostrado que la depleción de AhR es probable que provoca una parada parcial del mismo los TTFs, parada que es más significativa en las células envejecidas. El incremento en senescencia de las células adultas envejecidas *AhR*<sup>-/-</sup> también se encuentra correlacionado con el fenotipo de disfunción mitocondrial, ya que los TTFs exhiben un potencial de membrana mitocondrial significativamente menor que el de los TTFs *AhR*<sup>+/+</sup>.

Al cuestionarnos las causas por las que las células adultas carentes de AhR alcanzan niveles superiores de respuesta a senescencia, consideramos la posibilidad de

que el receptor AhR esté directamente implicado en la regulación de esta respuesta a estrés, dado que su ausencia ocasiona múltiples alteraciones en diferentes procesos celulares que finalmente afectan la fisiología y la homeostasis celular. (Dietrich & Kaina, 2010; Mulero-Navarro & Fernandez-Salguero, 2016). Mediante el análisis del indicador de daño genómico H2A<sub>xg</sub>.

En el estudio del papel de AhR en senescencia no debemos obviar la función toxicológica del receptor, ya que el daño inducido por especies reactivas de oxígeno y por otros agentes carcinogénicos actúa activando senescencia. Diferentes estudios sugieren que la sobreactivación de AhR por ligandos con propiedades tóxicas y carcinogénicas activa la respuesta a senescencia como un mecanismo de prevención frente a la inestabilidad genómica causada por los mismos (Ryu et al., 2019). Para estudiar el papel del receptor en este contexto, utilizamos fibroblastos humanos IMR90 que expresan niveles basales de AhR y los sometimos a irradiación y a tratamiento con agonistas carcinogénicos como el BaP, agonistas fisiológicos como FICZ o antagonistas no tóxicos como CH223191. Observamos que la activación del receptor por sus agonistas aumentó los niveles de senescencia (medida por la actividad  $\beta$ -galactosidasa y por la expresión del inhibidor p21). Estos resultados indican que, al menos en modelos de células fibroblásticas humanas, AhR modula positivamente senescencia. Esto puede indicar un efecto dependiente del tipo celular y/o de especie dado que, en hígado de ratón, la senescencia se induce más eficientemente en ausencia de AhR. Esta aparente discrepancia no es sorprendente ya que diferentes estudios demuestran que este receptor ejerce efectos dependientes del tipo celular, pudiendo promover o bloquear progresión tumoral, favorecer o inhibir migración y metástasis o activar o reprimir angiogénesis. (Feng, Cao, & Wang, 2013; Murray, Patterson, & Perdew, 2014; Neavin, Liu, Ray, & Weinshilboum, 2018)

Uno de los hallazgos más relevantes de este capítulo está relacionado con el desarrollo de tumores hepáticos que sucede durante el envejecimiento en ratones que carecen de la expresión de AhR, detectado en el 40% de los animales estudiados. El cáncer es una enfermedad asociada al envejecimiento y a la pérdida de homeostasis que

acontece en los organismos con el paso del tiempo. La senescencia, siendo una respuesta que previene la tumorigénesis al limitar la proliferación de células sometidas a estrés oncogénico, no obstante proporciona un entorno rico en citoquinas y en factores de crecimiento que estimula la proliferación de células no senescentes. Asimismo, la senescencia tiene efectos positivos en la regeneración tisular y en la reprogramación celular, apoyando la hipótesis de que promueve el estado indiferenciado de las células circundantes. En este sentido, se ha demostrado que la inducción de senescencia en células individuales *in vivo*, activa la expresión de marcadores específicos de células madre en tejido hepático (Ritschka et al., 2017). Varios estudios apoyan la idea de que las células senescentes presentes en los tejidos contribuyen a la formación de tumores proporcionando un nicho proliferativo para las células cancerosas.

En resultados previos de nuestro grupo, habíamos demostrado que el tejido hepático de ratones *AhR*<sup>-/-</sup> presenta una ventaja regenerativa con respecto al de ratones *AhR*<sup>+/+</sup> tras un daño agudo. Además, observamos que el hígado de animales *AhR*<sup>-/-</sup> era más proclive al desarrollo tumoral tras el tratamiento con un agente carcinógeno e, importantemente, que la ausencia del receptor compromete la maduración hepática en el paso de *preweaning* a adulto manteniendo los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> un hígado indiferenciado y principalmente diploide (Moreno-Marin et al., 2017; Moreno-Marín et al., 2018). En este estudio, hemos comprobado que en los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> existe una población más numerosa de células indiferenciadas con características de progenitores hepáticos que se mantiene durante el envejecimiento. El hecho de que los ratones carentes de AhR presenten un estado más acusado de indiferenciación del tejido hepático, puede ser indicativo de un incremento en la plasticidad celular que facilitaría la aparición de patologías hiperplásicas durante el envejecimiento.

Además, continuando con el estudio del papel de AhR en la respuesta a senescencia, hemos demostrado que los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> mantienen una población de células senescentes en hígado significativamente superior a la de los ratones *AhR*<sup>+/+</sup>, lo que proporcionaría un ambiente favorable a la proliferación de las células tumorales. En

este sentido, hemos comprobado que la secreción de citoquinas fundamentales en el SASPs como FGF y CCL8, que actúa atrayendo monocitos y macrófagos a las zonas de desarrollo tumoral, se producen en mayor medida en ausencia de AhR. Coherentemente con esos resultados, la metaloproteasa de matriz extracelular MMP-12, componente del SASPs que estimula la degradación de matriz extracelular remodelando el nicho de las células madre y facilitando su expansión, se encuentra también sobreexpresada en tejido hepático *AhR*<sup>-/-</sup>. Consistentemente, a nivel de expresión génica, existe sobreexpresión de genes de inflamación como TNF e IL1 y de los marcadores de senescencia p16<sup>INK4A</sup> y p21 en el hígado de ratones *AhR*<sup>-/-</sup> envejecidos. Hemos demostrado mediante ChIP-qPCR que AhR ejerce una regulación directa sobre estos genes durante el proceso de envejecimiento, uniéndose a secuencias consenso XRE localizadas en sus regiones promotoras. Esto sugiere que AhR actuaría regulando el ciclo celular y el fenotipo proinflamatorio que exhiben estas células durante el envejecimiento. Probablemente, AhR participe en un mecanismo de regulación inhibitoria de estos procesos, que se ve alterado en su ausencia y que conlleva un incremento en la senescencia e inflamación en los animales *AhR*<sup>-/-</sup>, propiciando la tumorigénesis hepática.

Durante el proceso de envejecimiento, los animales *AhR*<sup>+/+</sup> también sufren una pérdida de homeostasis que supone el desarrollo de tumores en hígado. A este respecto, hemos comprobado que el receptor AhR reduce sus niveles y su actividad durante el envejecimiento. Esto sugiere que existe una pérdida de la regulación negativa que el receptor ejercería sobre los procesos de senescencia e inflamación antes mencionados, facilitando así el desarrollo tumoral durante el envejecimiento. Estos resultados, en su conjunto, permiten proponer que AhR juega un papel crucial en la regulación de la senescencia y en el mantenimiento de las células indiferenciadas en hígado, procesos cuya desregulación deriva en el desarrollo de tumores durante el envejecimiento.



## CONCLUSIONES III

## CONCLUSIONES III

---

**La depleción de AhR favorece la respuesta celular a senescencia y el desarrollo de cáncer hepático.**

- La ausencia de AhR origina un aumento de la senescencia celular, disfunción mitocondrial e inhibición del ciclo celular.
- En ratones *AhR*<sup>-/-</sup> se aumenta drásticamente la tumorigénesis hepática asociada a envejecimiento.
- La depleción de AhR en ratones incrementa la incidencia de senescencia en el hígado y mantiene una mayor población de células indiferenciadas.
- El receptor AhR ejerce una regulación directa sobre la expresión de genes de senescencia e inflamación. La secreción de varios factores inductores del SASPs se ve aumentada en ausencia de AhR.
- La expresión y la actividad de AhR se ven reducidas durante el envejecimiento.

La activación de la vía de AhR por ligandos agonistas estimula la respuesta a senescencia en fibroblastos humanos IMR90.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, B. D., Birnbaum, L. S., & Perdew, G. H. (1995). Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dyn*, 204(2), 133-143.
- Abbott, B. D., Schmid, J. E., Pitt, J. A., Buckalew, A. R., Wood, C. R., Held, G. A., & Diliberto, J. J. (1999). Adverse Reproductive Outcomes in the Transgenic Ah Receptor-Deficient Mouse. *Toxicology and applied pharmacology*, 155(1), 62-70.
- Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., . . . Matsuda, T. (2001). Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem*, 276(34), 31475-31478.
- Aiken, C. E., Swoboda, P. P., Skepper, J. N., & Johnson, M. H. (2004). The direct measurement of embryogenic volume and nucleo-cytoplasmic ratio during mouse pre-implantation development. *Reproduction*, 128(5), 527-535. doi:10.1530/rep.1.00281
- Alexander, D. L., Ganem, L. G., Fernandez-Salguero, P., Gonzalez, F., & Jefcoate, C. R. (1998). Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis. *J Cell Sci*, 111 ( Pt 22), 3311-3322.
- Ambolet-Camoit, A., Bui, L. C., Pierre, S., Chevallier, A., Marchand, A., Coumoul, X., . . . Aggerbeck, M. (2010). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin counteracts the p53 response to a genotoxicant by upregulating expression of the metastasis marker agr2 in the hepatocarcinoma cell line HepG2. *Toxicol Sci*, 115(2), 501-512. doi:kfq082 [pii]
- Ambrosetti, D. C., Scholer, H. R., Dailey, L., & Basilico, C. (2000). Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *J Biol Chem*, 275(30), 23387-23397. doi:10.1074/jbc.M000932200
- Andreola, F., Calvisi, D. F., Elizondo, G., Jakowlew, S. B., Mariano, J., Gonzalez, F. J., & De Luca, L. M. (2004). Reversal of liver fibrosis in aryl hydrocarbon receptor null mice by dietary vitamin A depletion. *Hepatology*, 39(1), 157-166.
- Andreola, F., Fernandez-Salguero, P. M., Chiantore, M. V., Petkovich, M. P., Gonzalez, F. J., & De Luca, L. M. (1997). Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR<sup>-/-</sup>) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism. *Cancer Res*, 57(14), 2835-2838.
- Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A. (2009). Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*, 9, 187. doi:1471-2407-9-187 [pii]
- Angelos, M. G., & Kaufman, D. S. (2018). Advances in the role of the aryl hydrocarbon receptor to regulate early hematopoietic development. *Current opinion in hematology*, 25(4), 273-278.
- Antenos, M., Casper, R. F., & Brown, T. J. (2002). Interaction with Nedd8, a ubiquitin-like protein, enhances the transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, 277(46), 44028-44034.
- Artus, J. Piliszek A Hadjantonakis AK 2011 The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Developmental Biology*, 350, 393-404.
- Ashida, H., Nagy, S., & Matsumura, F. (2000). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced changes in activities of nuclear protein kinases and phosphatases affecting DNA binding activity of c-Myc

- and AP-1 in the livers of guinea pigs. *Biochem Pharmacol*, 59(7), 741-751. doi:S0006-2952(99)00387-1 [pii]
- Atlasi, Y., Mowla, S. J., Ziaee, S. A., & Bahrami, A. R. (2007). OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *International Journal of Cancer*, 120(7), 1598-1602.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development*, 17(1), 126-140.
- Baba, T., Mimura, J., Nakamura, N., Harada, N., Yamamoto, M., Morohashi, K., & Fujii-Kuriyama, Y. (2005). Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Mol Cell Biol*, 25(22), 10040-10051. doi:25/22/10040 [pii]
- Barhoover, M. A., Hall, J. M., Greenlee, W. F., & Thomas, R. S. (2010). Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4. *Mol Pharmacol*, 77(2), 195-201. doi:mol.109.059675 [pii]
- Barkauskas, C. E., Crounce, M. J., Rackley, C. R., Bowie, E. J., Keene, D. R., Stripp, B. R., . . . Hogan, B. L. (2013). Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *The Journal of clinical investigation*, 123(7), 3025-3036.
- Barnes-Ellerbe, S., Knudsen, K. E., & Puga, A. (2004). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin blocks androgen-dependent cell proliferation of LNCaP cells through modulation of pRB phosphorylation. *Mol Pharmacol*, 66(3), 502-511. doi:10.1124/mol.104.000356
- Beauséjour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P., & Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal*, 22(16), 4212-4222.
- Beischlag, T. V., Wang, S., Rose, D. W., Torchia, J., Reisz-Porszasz, S., Muhammad, K., . . . Hankinson, O. (2002). Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex. *Mol Cell Biol*, 22(12), 4319-4333.
- Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W., Regev, A., & Weinberg, R. A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature genetics*, 40(5), 499.
- Benedict, J. C., Lin, T. M., Loeffler, I. K., Peterson, R. E., & Flaws, J. A. (2000). Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicol Sci*, 56(2), 382-388.
- Berg, P., & Pongratz, I. (2001). Differential Usage of Nuclear Export Sequences Regulates Intracellular Localization of the Dioxin (Aryl Hydrocarbon) Receptor. *J Biol Chem*, 276(46), 43231-43238.
- Bergander, L., Wahlstrom, N., Alsberg, T., Bergman, J., Rannug, A., & Rannug, U. (2003). Characterization of in vitro metabolites of the aryl hydrocarbon receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole by liquid chromatography-mass spectrometry and NMR. *Drug Metab Dispos*, 31(2), 233-241.
- Berghard, A., Gradin, K., Pongratz, I., Whitelaw, M., & Poellinger, L. (1993). Cross-coupling of signal transduction pathways: the dioxin receptor mediates induction of cytochrome P-450IA1 expression via a protein kinase C-dependent mechanism. *Molecular and cellular biology*, 13(1), 677-689.
- Bernshausen, T., Jux, B., Esser, C., Abel, J., & Fritsche, E. (2006). Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice. *Arch Toxicol*, 80(4), 206-211. doi:10.1007/s00204-005-0025-5

- Binétruy, B., Smeal, T., & Karin, M. (1991). Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature*, 351(6322), 122.
- Blankenship, A., & Matsumura, F. (1997). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system. *Mol Pharmacol*, 52(4), 667-675.
- Blankenship, A. L., Suffia, M. C., Matsumura, F., Walsh, K. J., & Wiley, L. M. (1993). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) accelerates differentiation of murine preimplantation embryos in vitro. *Reprod Toxicol*, 7(3), 255-261.
- Blij, S., Frum, T., Akyol, A., Fearon, E., & Ralston, A. (2012). Maternal Cdx2 is dispensable for mouse development. *Development*, 139(21), 3969-3972.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., . . . Jenner, R. G. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6), 947-956.
- Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., . . . Ray, M. K. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, 441(7091), 349.
- Burbach, K. M., Poland, A., & Bradfield, C. A. (1992). Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(17), 8185-8189.
- Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology*, 75, 685-705.
- Campisi, J., & di Fagagna, F. d. A. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(9), 729.
- Campisi, J., & Robert, L. (2014). Cell senescence: role in aging and age-related diseases. In *Aging* (Vol. 39, pp. 45-61): Karger Publishers.
- Carrier, F., Owens, R., Nebert, D., & Puga, A. (1992). Dioxin-dependent activation of murine Cyp1a-1 gene transcription requires protein kinase C-dependent phosphorylation. *Molecular and cellular biology*, 12(4), 1856-1863.
- Caruso, J. A., Mathieu, P. A., Joiakim, A., Leeson, B., Kessel, D., Sloane, B. F., & Reiners, J. J., Jr. (2004). Differential susceptibilities of murine hepatoma 1c1c7 and Tao cells to the lysosomal photosensitizer NPe6: influence of aryl hydrocarbon receptor on lysosomal fragility and protease contents. *Mol Pharmacol*, 65(4), 1016-1028. doi:10.1124/mol.65.4.1016
- Carvajal-Gonzalez, J. M., Mulero-Navarro, S., Roman, A. C., Sauzeau, V., Merino, J. M., Bustelo, X. R., & Fernandez-Salguero, P. M. (2009). The dioxin receptor regulates the constitutive expression of the vav3 proto-oncogene and modulates cell shape and adhesion. *Mol Biol Cell*, 20(6), 1715-1727. doi:E08-05-0451 [pii]
- Carvajal-Gonzalez, J. M., Roman, A. C., Cerezo-Guisado, M. I., Rico-Leo, E. M., Martin-Partido, G., & Fernandez-Salguero, P. M. (2009). Loss of dioxin-receptor expression accelerates wound healing in vivo by a mechanism involving TGFbeta. *J Cell Sci*, 122(Pt 11), 1823-1833. doi:jcs.047274 [pii]
- Carver, L. A., & Bradfield, C. A. (1997). Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem*, 272(17), 11452-11456.
- Casado, F. L., Singh, K. P., & Gasiewicz, T. A. (2010). The aryl hydrocarbon receptor: regulation of hematopoiesis and involvement in the progression of blood diseases. *Blood Cells Mol Dis*, 44(4), 199-206. doi:S1079-9796(10)00006-9 [pii]

- Catena, R., Tiveron, C., Ronchi, A., Porta, S., Ferri, A., Tatangelo, L., . . . Nicolis, S. K. (2004). Conserved POU binding DNA sites in the Sox2 upstream enhancer regulate gene expression in embryonic and neural stem cells. *J Biol Chem*, 279(40), 41846-41857. doi:10.1074/jbc.M405514200
- Cauffman, G., Van de Velde, H., Liebaers, I., & Van Steirteghem, A. (2004). Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Molecular human reproduction*, 11(3), 173-181.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5), 643-655.
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., & Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*, 27(3), 275-280. doi:10.1038/nbt.1529
- Chan, W. K., Yao, G., Gu, Y. Z., & Bradfield, C. A. (1999). Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation. *J Biol Chem*, 274(17), 12115-12123.
- Chaudhary, S., Islam, Z., Mishra, V., Rawat, S., Ashraf, G. M., & Kolatkar, P. R. (2019). Sox2: A Regulatory Factor in Tumorigenesis and Metastasis. *Current Protein and Peptide Science*, 20(6), 495-504.
- Chazaud, C., & Yamanaka, Y. (2016). Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development*, 143(7), 1063-1074.
- Chen, W., An, J., Guo, J., Wu, Y., Yang, L., Dai, J., . . . Du, J. (2018). Sodium selenite attenuates lung adenocarcinoma progression by repressing SOX2-mediated stemness. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 81(5), 885-895.
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V. B., . . . Jiang, J. (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*, 133(6), 1106-1117.
- Chen, Y.-H., & Tukey, R. H. (1996). Protein kinase C modulates regulation of the CYP1A1 gene by the aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 271(42), 26261-26266.
- Chen, Y., Yu, D., Zhang, H., He, H., Zhang, C., Zhao, W., & Shao, R.-g. (2012). CD133+ EpCAM+ phenotype possesses more characteristics of tumor initiating cells in hepatocellular carcinoma Huh7 Cells. *International journal of biological sciences*, 8(7), 992.
- Chen, Z., Fillmore, C. M., Hammerman, P. S., Kim, C. F., & Wong, K.-K. (2014). Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nature Reviews Cancer*, 14(8), 535-546.
- Cheng, J., Li, W., Kang, B., Zhou, Y., Song, J., Dan, S., . . . Yin, S. (2015). Tryptophan derivatives regulate the transcription of Oct4 in stem-like cancer cells. *Nature communications*, 6, 7209.
- Cherfils, J., & Zeghouf, M. (2013). Regulation of small gtpases by gefs, gaps, and gdis. *Physiological reviews*, 93(1), 269-309.
- Chew, J. L., Loh, Y. H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W. L., Yeap, L. S., . . . Ng, H. H. (2005). Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 25(14), 6031-6046. doi:10.1128/MCB.25.14.6031-6046.2005
- Cho, Y. C., Zheng, W., & Jefcoate, C. R. (2004). Disruption of cell-cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol*, 199(3), 220-238.
- Chong, H., Vikis, H. G., & Guan, K.-L. (2003). Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cellular signalling*, 15(5), 463-469.

- Christian, J. L. (2012). Morphogen gradients in development: from form to function. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(1), 3-15. doi:10.1002/wdev.2
- Chuprin, A., Gal, H., Biron-Shental, T., Biran, A., Amiel, A., Rozenblatt, S., & Krizhanovsky, V. (2013). Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes & development*, 27(21), 2356-2366.
- Cicchini, M., Buza, E. L., Sagal, K. M., Gudiel, A. A., Durham, A. C., & Feldser, D. M. (2017). Context-dependent effects of amplified MAPK signaling during lung adenocarcinoma initiation and progression. *Cell reports*, 18(8), 1958-1969.
- Ciolino, H. P., Wang, T. T., & Yeh, G. C. (1998). Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity. *Cancer Res*, 58(13), 2754-2760.
- Cockburn, K., Biechele, S., Garner, J., & Rossant, J. (2013). The Hippo pathway member Nf2 is required for inner cell mass specification. *Current Biology*, 23(13), 1195-1201.
- Collado, M., & Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Reviews Cancer*, 10(1), 51-57.
- Contador-Troca, M., Alvarez-Barrientos, A., Barrasa, E., Rico-Leo, E. M., Catalina-Fernandez, I., Menacho-Marquez, M., . . . Fernandez-Salguero, P. M. (2013). The dioxin receptor has tumor suppressor activity in melanoma growth and metastasis. *Carcinogenesis*, 34(12), 2683-2693. doi:10.1093/carcin/bgt248
- Contador-Troca, M., Alvarez-Barrientos, A., Merino, J. M., Morales-Hernández, A., Rodríguez, M. I., Rey-Barroso, J., . . . Sáenz-Santamaría, J. (2015). Dioxin receptor regulates aldehyde dehydrogenase to block melanoma tumorigenesis and metastasis. *Molecular cancer*, 14(1), 148.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5, 99-118.
- Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., . . . Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology*, 6(12).
- Corchero, J., Martin-Partido, G., Dallas, S. L., & Fernandez-Salguero, P. M. (2004). Liver portal fibrosis in dioxin receptor-null mice that overexpress the latent transforming growth factor-beta-binding protein-1. *Int J Exp Pathol*, 85(5), 295-302.
- Cunningham, B. D. M., Threadgill, M. D., Yu-Fang, L., Santostefano, M., & Safe, S. (1996). Substituted Flavones as Aryl Hydrocarbon (Ah) Receptor Agonists and Antagonists. *Biochemical Pharmacology*, 51(8), 1077-1087.
- Davaapil, H., Brookes, J. P., & Yun, M. H. (2017). Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development. *Development*, 144(1), 106-114.
- Davarinos, N. A., & Pollenz, R. S. (1999). Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J.Biol.Chem.*, 274(40), 28708-28715.
- de Lau, W., Peng, W. C., Gros, P., & Clevers, H. (2014). The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes & development*, 28(4), 305-316.
- De Magalhães, J. P. (2013). How ageing processes influence cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(5), 357-365.
- de Oliveira, S. K., Hoffmeister, M., Gambaryan, S., Muller-Esterl, W., Guimaraes, J. A., & Smolenski, A. P. (2007). Phosphodiesterase 2A Forms a Complex with the Co-chaperone XAP2 and Regulates Nuclear Translocation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *J Biol Chem*, 282(18), 13656-13663.



- de Tomaso Portaz, A. C., Caimi, G. R., Sánchez, M., Chiappini, F., Randi, A. S., de Pisarev, D. L. K., & Alvarez, L. (2015). Hexachlorobenzene induces cell proliferation, and aryl hydrocarbon receptor expression (AhR) in rat liver preneoplastic foci, and in the human hepatoma cell line HepG2. AhR is a mediator of ERK1/2 signaling, and cell cycle regulation in HCB-treated HepG2 cells. *Toxicology*, 336, 36-47.
- Degner, S. C., Papoutsis, A. J., Selmin, O., & Romagnolo, D. F. (2009). Targeting of aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of cyclooxygenase-2 expression by the indole-3-carbinol metabolite 3,3'-diindolylmethane in breast cancer cells. *J Nutr*, 139(1), 26-32. doi:jn.108.099259 [pii]
- Demaria, M. (2020). Cellular Senescence and Tumor Promotion. *Geriatric Oncology*, 55-69.
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., . . . Dollé, M. E. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental cell*, 31(6), 722-733.
- Dever, D. P., & Opanashuk, L. A. (2012). The Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Contributes to the Proliferation of Human Medulloblastoma Cells. *Mol Pharmacol*. doi:mol.111.077305 [pii]
- Dietrich, C., & Kaina, B. (2010). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis*, 31(8), 1319-1328. doi:10.1093/carcin/bgq028
- Do, D. V., Ueda, J., Messerschmidt, D. M., Lorthongpanich, C., Zhou, Y., Feng, B., . . . Zhang, W. (2013). A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. *Genes & development*, 27(12), 1378-1390.
- Elferink, C. J., Ge, N. L., & Levine, A. (2001). Maximal aryl hydrocarbon receptor activity depends on an interaction with the retinoblastoma protein. *Mol Pharmacol*, 59(4), 664-673.
- Elizondo, G., Fernandez-Salguero, P., Sheikh, M. S., Kim, G. Y., Fornace, A. J., Lee, K. S., & Gonzalez, F. J. (2000a). Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. *Mol.Pharmacol.*, 57(5), 1056-1063.
- Elizondo, G., Fernandez-Salguero, P., Sheikh, M. S., Kim, G. Y., Fornace, A. J., Lee, K. S., & Gonzalez, F. J. (2000b). Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. *Mol Pharmacol*, 57(5), 1056-1063.
- Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., . . . Fujii-Kuriyama, Y. (1992). cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 184(1), 246-253. doi:0006-291X(92)91185-S [pii]
- Enan, E., & Matsumura, F. (1996). Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem Pharmacol*, 52(10), 1599-1612.
- Esser, C., & Rannug, A. (2015). The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology. *Pharmacol Rev*, 67(2), 259-279. doi:10.1124/pr.114.009001
- Esser, C., Rannug, A., & Stockinger, B. (2009). The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol*, 30(9), 447-454. doi:10.1016/j.it.2009.06.005
- Evans, M. J., Cabral, L. J., Stephens, R. J., & Freeman, G. (1975). Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO<sub>2</sub>. *Experimental and molecular pathology*, 22(1), 142-150.
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154.
- Feng, S., Cao, Z., & Wang, X. (2013). Role of aryl hydrocarbon receptor in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1836(2), 197-210.

- Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D. M., McPhail, T., Lee, S. S., Kimura, S., . . . Gonzalez, F. J. (1995). Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science*, 268(5211), 722-726.
- Fernandez-Salguero, P. M., Hilbert, D. M., Rudikoff, S., Ward, J. M., & Gonzalez, F. J. (1996). Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 140(1), 173-179.
- Fernandez-Salguero, P. M., Ward, J. M., Sundberg, J. P., & Gonzalez, F. J. (1997). Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet Pathol*, 34(6), 605-614.
- Folmes, C. D., Nelson, T. J., Martinez-Fernandez, A., Arrell, D. K., Lindor, J. Z., Dzeja, P. P., . . . Terzic, A. (2011). Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell metabolism*, 14(2), 264-271.
- Frankenberg, S., Gerbe, F., Bessonard, S., Belville, C., Pouchin, P., Bardot, O., & Chazaud, C. (2011). Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving Nanog and RTK signaling. *Developmental cell*, 21(6), 1005-1013.
- Franks, T. J., Colby, T. V., Travis, W. D., Tuder, R. M., Reynolds, H. Y., Brody, A. R., . . . Engelhardt, J. (2008). Resident cellular components of the human lung: current knowledge and goals for research on cell phenotyping and function. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(7), 763-766.
- Fraser, R., & Lin, C.-J. (2016). Epigenetic reprogramming of the zygote in mice and men: on your marks, get set, go! *Reproduction (Cambridge, England)*, 152(6), R211-R222. doi:10.1530/REP-16-0376
- Fujii-Kuriyama, Y., & Kawajiri, K. (2010). Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 86(1), 40-53.
- Fukazawa, T., Guo, M., Ishida, N., Yamatsuji, T., Takaoka, M., Yokota, E., . . . Okui, T. (2016). SOX2 suppresses CDKN1A to sustain growth of lung squamous cell carcinoma. *Scientific reports*, 6, 20113.
- Fukunaga, B. N., Probst, M. R., Reisz-Porszasz, S., & Hankinson, O. (1995). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, 270(49), 29270-29278.
- Gasiewicz, T. A., Henry, E. C., & Collins, L. L. (2008). Expression and activity of aryl hydrocarbon receptors in development and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 18(4), 279-321. doi:4de8c9fe5b6af78b,714c550a3fb330d1 [pii]
- Gasiewicz, T. A., Singh, K. P., & Casado, F. L. (2010). The aryl hydrocarbon receptor has an important role in the regulation of hematopoiesis: implications for benzene-induced hematopoietic toxicity. *Chem Biol Interact*, 184(1-2), 246-251. doi:S0009-2797(09)00470-0 [pii]
- Ge, N. L., & Elferink, C. J. (1998). A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle. *J Biol Chem*, 273(35), 22708-22713.
- Gluschnaider, U., Hidas, G., Cojocar, G., Yutkin, V., Ben-Neriah, Y., & Pikarsky, E. (2010). beta-TrCP inhibition reduces prostate cancer cell growth via upregulation of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One*, 5(2), e9060. doi:10.1371/journal.pone.0009060
- Gomez-Duran, A., Ballestar, E., Carvajal-Gonzalez, J. M., Marlowe, J. L., Puga, A., Esteller, M., & Fernandez-Salguero, P. M. (2008). Recruitment of CREB1 and histone deacetylase 2 (HDAC2) to the mouse Ltbp-1 promoter regulates its constitutive expression in a dioxin receptor-dependent manner. *J Mol Biol*, 380(1), 1-16. doi:S0022-2836(08)00514-7 [pii]

- Gomez-Duran, A., Mulero-Navarro, S., Chang, X., & Fernandez-Salguero, P. M. (2006). LTBP-1 blockade in dioxin receptor-null mouse embryo fibroblasts decreases TGF-beta activity: Role of extracellular proteases plasmin and elastase. *J Cell Biochem*, 97(2), 380-392.
- González-Rico, F. J., Vicente-García, C., Fernández, A., Muñoz-Santos, D., Montoliu, L., Morales-Hernández, A., . . . Fernández-Salguero, P. M. (2020). Alu retrotransposons modulate Nanog expression through dynamic changes in regional chromatin conformation via aryl hydrocarbon receptor. *Epigenetics & Chromatin*, 13(1), 1-13.
- Gonzalez, F. J., & Fernandez-Salguero, P. (1998). The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos*, 26(12), 1194-1198.
- Goode, G., Pratap, S., & Eltom, S. E. (2014). Depletion of the aryl hydrocarbon receptor in MDA-MB-231 human breast cancer cells altered the expression of genes in key regulatory pathways of cancer. *PloS one*, 9(6), e100103. doi:10.1371/journal.pone.0100103
- Gradin, K., Whitelaw, M. L., Toftgard, R., Poellinger, L., & Berghard, A. (1994). A tyrosine kinase-dependent pathway regulates ligand-dependent activation of the dioxin receptor in human keratinocytes. *J Biol Chem*, 269(38), 23800-23807.
- Gramatzki, D., Pantazis, G., Schittenhelm, J., Tabatabai, G., Kohle, C., Wick, W., . . . Tritschler, I. (2009). Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF-beta/Smad pathway in human glioblastoma cells. *Oncogene*, 28(28), 2593-2605. doi:onc2009104 [pii]
- Greenlee, W. F., & Poland, A. (1979). Nuclear uptake of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J and DBA/2J mice. Role of the hepatic cytosol receptor protein. *J Biol Chem*, 254(19), 9814-9821.
- Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., . . . Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer cell*, 4(2), 111-120.
- Guerrina, N., Traboulsi, H., Eidelman, D. H., & Bagloli, C. J. (2018). The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Maintenance of Lung Health. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3882.
- Hahn, M. E., Karchner, S. I., Shapiro, M. A., & Perera, S. A. (1997). Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(25), 13743-13748.
- Haigis, K. M., Kendall, K. R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M. C., Glickman, J. N., . . . Shannon, K. M. (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature genetics*, 40(5), 600.
- Hall, J. M., Barhoover, M. A., Kazmin, D., McDonnell, D. P., Greenlee, W. F., & Thomas, R. S. (2010). Activation of the aryl-hydrocarbon receptor inhibits invasive and metastatic features of human breast cancer cells and promotes breast cancer cell differentiation. *Mol Endocrinol*, 24(2), 359-369. doi:me.2009-0346 [pii]
- Harstad, E. B., Guite, C. A., Thomae, T. L., & Bradfield, C. A. (2006). Liver deformation in Ahr-/- mice: Evidence for aberrant hepatic perfusion in early development. *Mol Pharmacol*.
- Hayashi, S., Okabe-Kado, J., Honma, Y., & Kawajiri, K. (1995). Expression of Ah receptor (TCDD receptor) during human monocytic differentiation. *Carcinogenesis*, 16(6), 1403-1409.
- Hayashibara, T., Yamada, Y., Mori, N., Harasawa, H., Sugahara, K., Miyanishi, T., . . . Tomonaga, M. (2003). Possible involvement of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult T-cell leukemia (ATL) leukemogenesis: constitutive activation of AhR in ATL. *Biochem Biophys Res Commun*, 300(1), 128-134.

- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 37(3), 614-636.
- Hayflick, L., & MOORHEAD, P. S. (1964). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. In *Cytogenetics of cells in culture* (pp. 155-173): Elsevier.
- Herbst, R., & Heymach, J. (2008). e Lippman SM. *Lung Cancer. N Engl J Med*, 359(13), 1367-1380.
- Hirate, Y., & Sasaki, H. (2014). The role of angiomin phosphorylation in the Hippo pathway during preimplantation mouse development. *Tissue Barriers*, 2(1), 1181-1194.
- Hobbs, G. A., Der, C. J., & Rossman, K. L. (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci*, 129(7), 1287-1292.
- HSU, L. C., CHANG, W.-C., HOFFMANN, I., & DUESTER, G. (1999). Molecular analysis of two closely related mouse aldehyde dehydrogenase genes: identification of a role for Aldh1, but not Aldh-pb, in the biosynthesis of retinoic acid. *Biochemical Journal*, 339(2), 387-395.
- Hu, W., Zhao, J., & Pei, G. (2013). Activation of aryl hydrocarbon receptor (ahr) by tranilast, an anti-allergy drug, promotes miR-302 expression and cell reprogramming. *Journal of Biological Chemistry*, 288(32), 22972-22984.
- Huang, G., & Elferink, C. J. (2005). Multiple mechanisms are involved in Ah receptor-mediated cell cycle arrest. *Mol Pharmacol*, 67(1), 88-96.
- Huch, M., Bonfanti, P., Boj, S. F., Sato, T., Loomans, C. J., Van De Wetering, M., . . . Gracanin, A. (2013). Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *The EMBO journal*, 32(20), 2708-2721.
- Ibabao, C. N., Bunaciu, R. P., Schaefer, D. M., & Yen, A. (2015). The AhR agonist VAF347 augments retinoic acid-induced differentiation in leukemia cells. *FEBS open bio*, 5, 308-318.
- Iida, K., Mimura, J., Itoh, K., Ohyama, C., Fujii-Kuriyama, Y., Shimazui, T., . . . Yamamoto, M. (2010). Suppression of AhR signaling pathway is associated with the down-regulation of UDP-glucuronosyltransferases during BBN-induced urinary bladder carcinogenesis in mice. *J Biochem*, 147(3), 353-360. doi:mvp169 [pii]
- Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y., & Kawajiri, K. (1998). Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, 273(5), 2895-2904.
- Ikuta, T., & Kawajiri, K. (2006). Zinc finger transcription factor Slug is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor. *Exp Cell Res*, 312(18), 3585-3594.
- Ikuta, T., Kobayashi, Y., & Kawajiri, K. (2004). Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 317(2), 545-550. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.076
- Ikuta, T., Namiki, T., Fujii-Kuriyama, Y., & Kawajiri, K. (2009). AhR protein trafficking and function in the skin. *Biochem Pharmacol*, 77(4), 588-596. doi:S0006-2952(08)00718-1 [pii]
- Ikuta, T., Ohba, M., Zouboulis, C. C., Fujii-Kuriyama, Y., & Kawajiri, K. (2010). B lymphocyte-induced maturation protein 1 is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor. *J Dermatol Sci*, 58(3), 211-216. doi:10.1016/j.jdermsci.2010.04.003
- Ikuta, T., Tachibana, T., Watanabe, J., Yoshida, M., Yoneda, Y., & Kawajiri, K. (2000). Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biochem (Tokyo)*, 127(3), 503-509.

- Ito, T., Tsukumo, S., Suzuki, N., Motohashi, H., Yamamoto, M., Fujii-Kuriyama, Y., . . . Nohara, K. (2004). A constitutively active arylhydrocarbon receptor induces growth inhibition of jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest. *J Biol Chem*, 279(24), 25204-25210.
- Jackson, E. L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R. T., Crowley, D., Montoya, R., . . . Tuveson, D. A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes & development*, 15(24), 3243-3248.
- Jacob, F. (1977). Mouse teratocarcinoma and embryonic antigens. *Immunological reviews*, 33(1), 3-32.
- Jaenisch, R., & Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 132(4), 567-582. doi:10.1016/j.cell.2008.01.015
- Jana, N. R., Sarkar, S., Ishizuka, M., Yonemoto, J., Tohyama, C., & Sone, H. (1999). Cross-talk between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and testosterone signal transduction pathways in LNCaP prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 256(3), 462-468.
- Jeffery, P., & Li, D. (1997). Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *European Respiratory Journal*, 10(7), 1655-1662.
- Jiang, F., Qiu, Q., Khanna, A., Todd, N. W., Deepak, J., Xing, L., . . . Stass, S. A. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Molecular cancer research*, 7(3), 330-338.
- Johnson, L., Mercer, K., Greenbaum, D., Bronson, R. T., Crowley, D., Tuveson, D. A., & Jacks, T. (2001). Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature*, 410(6832), 1111-1116.
- Johnson, M. H., & Ziomek, C. A. (1981). The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*, 24(1), 71-80.
- Jones, L. C., Okino, S. T., Gonda, T. J., & Whitlock, J. P., Jr. (2002). Myb-binding protein 1a augments AhR-dependent gene expression. *J Biol Chem*, 277(25), 22515-22519.
- Kang, T.-W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., . . . Potapova, A. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, 479(7374), 547-551.
- Kazlauskas, A., Poellinger, L., & Pongratz, I. (1999). Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem*, 274(19), 13519-13524.
- Kazlauskas, A., Sundstrom, S., Poellinger, L., & Pongratz, I. (2001). The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol*, 21(7), 2594-2607. doi:10.1128/MCB.21.7.2594-2607.2001
- Keyes, B. E., & Fuchs, E. (2018). Stem cells: Aging and transcriptional fingerprints. *Journal of Cell Biology*, 217(1), 79-92.
- Kim, B. R., Van de Laar, E., Cabanero, M., Tarumi, S., Hasenoeder, S., Wang, D., . . . Sakashita, S. (2016). SOX2 and PI3K cooperate to induce and stabilize a squamous-committed stem cell injury state during lung squamous cell carcinoma pathogenesis. *PLoS biology*, 14(11).
- Kim, C. F. B., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., . . . Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, 121(6), 823-835.
- Kim, Y., Kim, H. S., Cui, Z. Y., Lee, H.-S., Ahn, J. S., Park, C. K., . . . Ahn, M.-J. (2009). Clinicopathological implications of EpCAM expression in adenocarcinoma of the lung. *Anticancer research*, 29(5), 1817-1822.

- Kim, Y., Sharov, A. A., McDole, K., Cheng, M., Hao, H., Fan, C.-M., . . . Zheng, Y. (2011). Mouse B-type lamins are required for proper organogenesis but not by embryonic stem cells. *Science*, 334(6063), 1706-1710.
- Kimura, H., Kato, H., Faried, A., Sohda, M., Nakajima, M., Fukai, Y., . . . Kuwano, H. (2007). Prognostic significance of EpCAM expression in human esophageal cancer. *International journal of oncology*, 30(1), 171-179.
- Klinge, C. M., Bowers, J. L., Kulakosky, P. C., Kamboj, K. K., & Swanson, H. I. (1999). The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements. *Mol Cell Endocrinol*, 157(1-2), 105-119. doi:S0303-7207(99)00165-3 [pii]
- Klinge, C. M., Jernigan, S. C., Risinger, K. E., Lee, J. E., Tyulmenkov, V. V., Falkner, K. C., & Prough, R. A. (2001). Short heterodimer partner (SHP) orphan nuclear receptor inhibits the transcriptional activity of aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT). *Arch Biochem Biophys*, 390(1), 64-70.
- Knutson, J. C., & Poland, A. (1980). Keratinization of mouse teratoma cell line XB produced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: an in vitro model of toxicity. *Cell*, 22(1 Pt 1), 27-36.
- Ko, C. I., Fan, Y., de Gannes, M., Wang, Q., Xia, Y., & Puga, A. (2016). Repression of the Aryl Hydrocarbon Receptor Is Required to Maintain Mitotic Progression and Prevent Loss of Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 34(12), 2825-2839. doi:10.1002/stem.2456
- Ko, C. I., Wang, Q., Fan, Y., Xia, Y., & Puga, A. (2014). Pluripotency factors and Polycomb Group proteins repress aryl hydrocarbon receptor expression in murine embryonic stem cells. *Stem Cell Res*, 12(1), 296-308. doi:10.1016/j.scr.2013.11.007
- Ko, H. P., Okino, S. T., Ma, Q., & Whitlock, J. P., Jr. (1997). Transactivation domains facilitate promoter occupancy for the dioxin-inducible CYP1A1 gene in vivo. *Mol Cell Biol*, 17(7), 3497-3507.
- Kobayashi, A., Numayama-Tsuruta, K., Sogawa, K., & Fujii-Kuriyama, Y. (1997). CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J Biochem (Tokyo)*, 122(4), 703-710.
- Kobayashi, A., Sogawa, K., & Fujii-Kuriyama, Y. (1996). Cooperative interaction between AhR.Arnt and Sp1 for the drug-inducible expression of CYP1A1 gene. *J Biol Chem*, 271(21), 12310-12316.
- Kohle, C., Gschaidmeier, H., Lauth, D., Topell, S., Zitzer, H., & Bock, K. W. (1999). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells. *Arch Toxicol*, 73(3), 152-158.
- Kojima, Y., Tam, O. H., & Tam, P. P. (2014). Timing of developmental events in the early mouse embryo. *Semin Cell Dev Biol*, 34, 65-75. doi:10.1016/j.semcdb.2014.06.010
- Koliopanos, A., Kleeff, J., Xiao, Y., Safe, S., Zimmermann, A., Buchler, M. W., & Friess, H. (2002). Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for pancreatic cancer. *Oncogene*, 21(39), 6059-6070.
- Kolluri, S. K., Balduf, C., Hofmann, M., & Gottlicher, M. (2001). Novel target genes of the Ah (dioxin) receptor: transcriptional induction of N-myristoyltransferase 2. *Cancer Res*, 61(23), 8534-8539.
- Kolluri, S. K., Weiss, C., Koff, A., & Gottlicher, M. (1999). p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev*, 13(13), 1742-1753.
- Korzeniewski, N., Wheeler, S., Chatterjee, P., Duensing, A., & Duensing, S. (2010). A novel role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in centrosome amplification - implications for chemoprevention. *Mol Cancer*, 9, 153. doi:1476-4598-9-153 [pii]

- Koutsourakis, M., Langeveld, A., Patient, R., Beddington, R., & Grosveld, F. (1999). The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development*, 126(4), 723-732.
- Krizhanovsky, V., Xue, W., Zender, L., Yon, M., Hernando, E., & Lowe, S. (2008). *Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology*. Paper presented at the Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology.
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12072-12077.
- Krupa, A., Descamps, M., Willart, J.-F., Strach, B., Wyska, E. b., Jachowicz, R., & Danede, F. (2016). High-energy ball milling as green process to vitrify tadalafil and improve bioavailability. *Molecular pharmaceutics*, 13(11), 3891-3902.
- Kumar, M. B., Ramadoss, P., Reen, R. K., Vanden Heuvel, J. P., & Perdew, G. H. (2001). The Q-rich subdomain of the human Ah receptor transactivation domain is required for dioxin-mediated transcriptional activity. *J Biol Chem*, 276(45), 42302-42310.
- Kumar, M. B., Tarpey, R. W., & Perdew, G. H. (1999). Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs. *J Biol Chem*, 274(32), 22155-22164.
- Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S.-y., Suemori, H., . . . Tada, T. (2005). Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Molecular and cellular biology*, 25(6), 2475-2485.
- Laberge, R., Adler, D., DeMaria, M., Mechtouf, N., Teachenor, R., Cardin, G., . . . Rodier, F. (2013). Mitochondrial DNA damage induces apoptosis in senescent cells. *Cell death & disease*, 4(7), e727.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lahvis, G. P., Lindell, S. L., Thomas, R. S., McCuskey, R. S., Murphy, C., Glover, E., . . . Bradfield, C. A. (2000). Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(19), 10442-10447.
- Lahvis, G. P., Pyzalski, R. W., Glover, E., Pitot, H. C., McElwee, M. K., & Bradfield, C. A. (2005). The aryl hydrocarbon receptor is required for developmental closure of the ductus venosus in the neonatal mouse. *Mol Pharmacol*, 67(3), 714-720.
- Laiosa, M. D., Tate, E. R., Ahrenhoerster, L. S., Chen, Y., & Wang, D. (2015). Effects of developmental activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on long-term self-renewal of murine hematopoietic stem cells. *Environmental health perspectives*, 124(7), 957-965.
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., . . . Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging cell*, 5(2), 187-195.
- Lee, S. S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E. J., Owens, J. W., Kroetz, D. L., . . . Gonzalez, F. J. (1995). Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol*, 15(6), 3012-3022.
- Lees, M. J., & Whitelaw, M. L. (1999). Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt. *Mol Cell Biol*, 19(8), 5811-5822.
- Leung, C. Y., & Zernicka-Goetz, M. (2013). Angiomotin prevents pluripotent lineage differentiation in mouse embryos via Hippo pathway-dependent and-independent mechanisms. *Nature communications*, 4, 2251.

- Li, S., Balmain, A., & Counter, C. M. (2018). A model for RAS mutation patterns in cancers: Finding the sweet spot. *Nature Reviews Cancer*, 1.
- Liu, C.-g., Lu, Y., Wang, B.-b., Zhang, Y.-j., Zhang, R.-s., Lu, Y., . . . Lu, P. (2011). Clinical implications of stem cell gene Oct-4 expression in breast cancer. *Annals of surgery*, 253(6), 1165-1171.
- Lund, A. K., Goens, M. B., Kanagy, N. L., & Walker, M. K. (2003). Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure. *Toxicol Appl Pharmacol*, 193(2), 177-187. doi:S0041008X03004149 [pii]
- Lwin, S. T., Edwards, C. M., & Silbermann, R. (2016). Preclinical animal models of multiple myeloma. *BoneKey reports*, 5.
- Ma, Q., & Baldwin, K. T. (2000). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activation and DNA binding of AhR. *J Biol Chem*, 275(12), 8432-8438.
- Ma, Q., & Baldwin, K. T. (2002). A cycloheximide-sensitive factor regulates TCDD-induced degradation of the aryl hydrocarbon receptor. *Chemosphere*, 46(9-10), 1491-1500.
- Ma, Q., Renzelli, A. J., Baldwin, K. T., & Antonini, J. M. (2000). Superinduction of CYP1A1 gene expression. Regulation of 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of Ah receptor by cycloheximide. *J Biol Chem*, 275(17), 12676-12683.
- Ma, Q., & Whitlock, J. P., Jr. (1996). The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Mol Cell Biol*, 16(5), 2144-2150.
- Ma, Q., & Whitlock, J. P., Jr. (1997). A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem*, 272(14), 8878-8884.
- Madeira-Coelho, A. (1988). Biology of normal proliferating cells in vitro. In *Relevance for In Vitro Aging* (pp. 17).
- Mainardi, S., Mijimolle, N., Francoz, S., Vicente-Dueñas, C., Sánchez-García, I., & Barbacid, M. (2014). Identification of cancer initiating cells in K-Ras driven lung adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 255-260.
- Maltepe, E., Schmidt, J. V., Baunoch, D., Bradfield, C. A., & Simon, M. C. (1997). Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature*, 386(6623), 403-407.
- Malumbres, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 year. *Nat Rev Cancer*, 3, 7-13.
- Manzanares, M., & Rodriguez, T. A. (2013). Development: Hippo signalling turns the embryo inside out. *Current Biology*, 23(13), R559-R561.
- Marlowe, J. L., Knudsen, E. S., Schwemberger, S., & Puga, A. (2004). The aryl hydrocarbon receptor displaces p300 from E2F-dependent promoters and represses S phase-specific gene expression. *J Biol Chem*, 279(28), 29013-29022.
- Mascanfroni, I. D., Takenaka, M. C., Yeste, A., Patel, B., Wu, Y., Kenison, J. E., . . . Quintana, F. J. (2015). Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- $\alpha$ . *Nat Med*, 21(6), 638-646. doi:10.1038/nm.3868
- Matikainen, T., Perez, G. I., Jurisicova, A., Pru, J. K., Schlezinger, J. J., Ryu, H. Y., . . . Tilly, J. L. (2001). Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet*, 28(4), 355-360.



- Matsumoto, Y., Ide, F., Kishi, R., Akutagawa, T., Sakai, S., Nakamura, M., . . . Nakatsuru, Y. (2007). Aryl hydrocarbon receptor plays a significant role in mediating airborne particulate-induced carcinogenesis in mice. *Environ Sci Technol*, 41(10), 3775-3780.
- Matthews, J., Wihlen, B., Thomsen, J., & Gustafsson, J. A. (2005). Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor alpha to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters. *Mol Cell Biol*, 25(13), 5317-5328.
- McConnell, B. B., Starborg, M., Brookes, S., & Peters, G. (1998). Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Current Biology*, 8(6), 351-354.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., . . . Tafuri, A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8), 1263-1284.
- McHugh, D., & Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology*, 217(1), 65-77.
- McKay, M., & Morrison, D. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*, 26(22), 3113.
- Mebratu, Y., & Tesfagzi, Y. (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell cycle*, 8(8), 1168-1175.
- Meilhac, S. M., Adams, R. J., Morris, S. A., Danckaert, A., Le Garrec, J.-F., & Zernicka-Goetz, M. (2009). Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. *Developmental biology*, 331(2), 210-221.
- Meloche, S., & Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1-to-S-phase transition. *Oncogene*, 26(22), 3227.
- Meyer, B. K., Pray-Grant, M. G., Vanden Heuvel, J. P., & Perdew, G. H. (1998). Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol*, 18(2), 978-988.
- Mezrich, J. D., Fechner, J. H., Zhang, X., Johnson, B. P., Burlingham, W. J., & Bradfield, C. A. (2010). An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol*, 185(6), 3190-3198. doi:10.4049/jimmunol.0903670
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., & Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev*, 13(1), 20-25.
- Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T. N., Nakao, K., . . . Fujii-Kuriyama, Y. (1997). Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells*, 2(10), 645-654.
- Minsavage, G. D., Park, S. K., & Gasiewicz, T. A. (2004). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) tyrosine 9, a residue that is essential for AhR DNA binding activity, is not a phosphoresidue but augments AhR phosphorylation. *J Biol Chem*, 279(20), 20582-20593.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., . . . Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), 631-642.
- Moennikes, O., Loeppen, S., Buchmann, A., Andersson, P., Ittrich, C., Poellinger, L., & Schwarz, M. (2004). A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Res*, 64(14), 4707-4710.
- Morales-Hernandez, A., Gonzalez-Rico, F. J., Roman, A. C., Rico-Leo, E., Alvarez-Barrientos, A., Sanchez, L., . . . Fernandez-Salguero, P. M. (2016). Alu retrotransposons promote differentiation of human

- carcinoma cells through the aryl hydrocarbon receptor. *Nucleic Acids Res*, 44(10), 4665-4683. doi:10.1093/nar/gkw095
- Morales-Hernandez, A., Nacarino-Palma, A., Moreno-Marin, N., Barrasa, E., Paniagua-Quinones, B., Catalina-Fernandez, I., . . . Fernandez-Salguero, P. M. (2017). Lung regeneration after toxic injury is improved in absence of dioxin receptor. *Stem Cell Res*, 25, 61-71. doi:10.1016/j.scr.2017.10.009
- Moreno-Marin, N., Barrasa, E., Morales-Hernandez, A., Paniagua, B., Blanco-Fernandez, G., Merino, J. M., & Fernandez-Salguero, P. M. (2017). Dioxin Receptor Adjusts Liver Regeneration After Acute Toxic Injury and Protects Against Liver Carcinogenesis. *Sci Rep*, 7(1), 10420. doi:10.1038/s41598-017-10984-w
- Moreno-Marín, N., Merino, J. M., Alvarez-Barrientos, A., Patel, D. P., Takahashi, S., González-Sancho, J. M., . . . Gonzalez, F. J. (2018). Aryl hydrocarbon receptor promotes liver polyploidization and inhibits PI3K, ERK, and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *iScience*, 4, 44-63.
- Morris, R. J., Tryson, K. A., & Wu, K. Q. (2000). Evidence that the epidermal targets of carcinogen action are found in the interfollicular epidermis of infundibulum as well as in the hair follicles. *Cancer Res*, 60(2), 226-229.
- Mosteiro, L., Pantoja, C., de Martino, A., & Serrano, M. (2018). Senescence promotes in vivo reprogramming through p16 INK 4a and IL-6. *Aging cell*, 17(2), e12711.
- Mulero-Navarro, S., Carvajal-Gonzalez, J. M., Herranz, M., Ballestar, E., Fraga, M. F., Ropero, S., . . . Fernandez-Salguero, P. M. (2006). The dioxin receptor is silenced by promoter hypermethylation in human acute lymphoblastic leukemia through inhibition of Sp1 binding. *Carcinogenesis*, 27(5), 1099-1104.
- Mulero-Navarro, S., & Fernandez-Salguero, P. M. (2016). New Trends in Aryl Hydrocarbon Receptor Biology. *Front Cell Dev Biol*, 4, 45. doi:10.3389/fcell.2016.00045
- Mulero-Navarro, S., Pozo-Guisado, E., Perez-Mancera, P. A., Alvarez-Barrientos, A., Catalina-Fernandez, I., Hernandez-Nieto, E., . . . Fernandez-Salguero, P. M. (2005). Immortalized mouse mammary fibroblasts lacking dioxin receptor have impaired tumorigenicity in a subcutaneous mouse xenograft model. *J Biol Chem*, 280(31), 28731-28741.
- Munro, J., Barr, N. I., Ireland, H., Morrison, V., & Parkinson, E. K. (2004). Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Experimental cell research*, 295(2), 525-538.
- Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., . . . Collado, M. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, 155(5), 1104-1118.
- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(7), 482-496.
- Murray, I. A., Patterson, A. D., & Perdew, G. H. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nature Reviews Cancer*, 14(12), 801-814.
- Neavin, D. R., Liu, D., Ray, B., & Weinshilboum, R. M. (2018). The role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in immune and inflammatory diseases. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3851.
- Nebert, D. W., Roe, A. L., Dieter, M. Z., Solis, W. A., Yang, Y., & Dalton, T. P. (2000). Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 59(1), 65-85.
- Nguyen, T. A., Hoivik, D., Lee, J. E., & Safe, S. (1999). Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex. *Arch Biochem Biophys*, 367(2), 250-257.

- Nichols, J., Silva, J., Roode, M., & Smith, A. (2009). Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development*, 136(19), 3215-3222.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., . . . Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95(3), 379-391.
- Nie, M., Blankenship, A. L., & Giesy, J. P. (2001). Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 10(1-2), 17-27.
- Niermann, T., Schmutz, S., Erne, P., & Resink, T. (2003). Aryl hydrocarbon receptor ligands repress T-cadherin expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 300(4), 943-949.
- Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A., & Muramatsu, M. (1999). The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol*, 19(8), 5453-5465.
- Nishioka, N., Inoue, K.-i., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., . . . Ogonuki, N. (2009). The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophoblast from inner cell mass. *Developmental cell*, 16(3), 398-410.
- Niwa, H., Miyazaki, J.-i., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics*, 24(4), 372.
- Oesch-Bartlomowicz, B., Huelster, A., Wiss, O., Antoniou-Lipfert, P., Dietrich, C., Arand, M., . . . Oesch, F. (2005). Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(26), 9218-9223. doi:0503488102 [pii]
- Ogi, T., Mimura, J., Hikida, M., Fujimoto, H., Fujii-Kuriyama, Y., & Ohmori, H. (2001). Expression of human and mouse genes encoding polkappa: testis-specific developmental regulation and AhR-dependent inducible transcription. *Genes Cells*, 6(11), 943-953.
- Ohnishi, Y., Totoki, Y., Toyoda, A., Watanabe, T., Yamamoto, Y., Tokunaga, K., . . . Hohjoh, H. (2012). Active role of small non-coding RNAs derived from SINE/B1 retrotransposon during early mouse development. *Molecular biology reports*, 39(2), 903-909.
- Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., . . . Kato, S. (2007). Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature*, 446(7135), 562-566. doi:nature05683 [pii]
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., . . . Kato, S. (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 423(6939), 545-550. doi:10.1038/nature01606
- Okey, A. B., Bondy, G. P., Mason, M. E., Kahl, G. F., Eisen, H. J., Guenther, T. M., & Nebert, D. W. (1979). Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of the cytosolic inducer-receptor complex and evidence for its nuclear translocation. *J Biol Chem*, 254(22), 11636-11648.
- Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H., & Ishikawa, F. (2005). Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 280(7), 5307-5317. doi:10.1074/jbc.M410015200
- Ostrem, J. M., Peters, U., Sos, M. L., Wells, J. A., & Shokat, K. M. (2013). K-Ras (G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*, 503(7477), 548.
- Park, H. (1999). Aromatic hydrocarbon nuclear translocator as a common component for the hypoxia- and dioxin-induced gene expression. *Mol Cells*, 9(2), 172-178.

- Park, S., Henry, E. C., & Gasiewicz, T. A. (2000). Regulation of DNA binding activity of the ligand-activated aryl hydrocarbon receptor by tyrosine phosphorylation. *Arch Biochem Biophys*, 381(2), 302-312. doi:S0003986100919994 [pii]
- Peng, L., Mayhew, C. N., Schnekenburger, M., Knudsen, E. S., & Puga, A. (2008). Repression of Ah receptor and induction of transforming growth factor-beta genes in DEN-induced mouse liver tumors. *Toxicology*, 246(2-3), 242-247. doi:S0300-483X(08)00011-5 [pii]
- Peng, T. L., Chen, J., Mao, W., Liu, X., Tao, Y., Chen, L. Z., & Chen, M. H. (2009). Potential therapeutic significance of increased expression of aryl hydrocarbon receptor in human gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 15(14), 1719-1729.
- Perdew, G. H. (1988). Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J Biol Chem*, 263(27), 13802-13805.
- Pesce, M., & Schöler, H. R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem cells*, 19(4), 271-278.
- Peters, J. M., Narotsky, M. G., Elizondo, G., Fernandez-Salguero, P. M., Gonzalez, F. J., & Abbott, B. D. (1999). Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice. *Toxicol Sci*, 47(1), 86-92.
- Peters, J. M., & Wiley, L. M. (1995). Evidence that murine preimplantation embryos express aryl hydrocarbon receptor. *Toxicology and applied pharmacology*, 134(2), 214-221.
- Peterson, T. C., Hodgson, P., Fernandez-Salguero, P., Neumeister, M., & Gonzalez, F. J. (2000). Hepatic fibrosis and cytochrome P450: experimental models of fibrosis compared to AHR knockout mice. *Hepatol Res*, 17(2), 112-125.
- Phelan, D. M., Brackney, W. R., & Denison, M. S. (1998). The Ah receptor can bind ligand in the absence of receptor-associated heat-shock protein 90. *Arch Biochem Biophys*, 353(1), 47-54. doi:S0003-9861(97)90614-7 [pii]
- Platten, M., Wick, W., & Van den Eynde, B. J. (2012). Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Res*, 72(21), 5435-5440. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0569
- Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., & Hadjantonakis, A.-K. (2008). Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development*, 135(18), 3081-3091.
- Pohjanvirta, R., Miettinen, H., Sankari, S., Hegde, N., & Linden, J. (2012). Unexpected gender difference in sensitivity to the acute toxicity of dioxin in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 262(2), 167-176. doi:10.1016/j.taap.2012.04.032
- Poland, A., Glover, E., & Kende, A. S. (1976). Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem*, 251(16), 4936-4946.
- Poland, A., & Knutson, J. C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 22, 517-554.
- Pollenz, R. S., & Buggy, C. (2006). Ligand-dependent and -independent degradation of the human aryl hydrocarbon receptor (hAHR) in cell culture models. *Chem Biol Interact*, 164(1-2), 49-59. doi:S0009-2797(06)00227-4 [pii]

- Pollenz, R. S., Wilson, S. E., & Dougherty, E. J. (2006). Role of endogenous XAP2 protein on the localization and nucleocytoplasmic shuttling of the endogenous mouse Ahb-1 receptor in the presence and absence of ligand. *Mol Pharmacol*, 70(4), 1369-1379.
- Prior, I. A., Lewis, P. D., & Mattos, C. (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer research*, 72(10), 2457-2467.
- Procopio, M., Lahm, A., Tramontano, A., Bonati, L., & Pitea, D. (2002). A model for recognition of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by the aryl hydrocarbon receptor. *Eur J Biochem*, 269(1), 13-18.
- Puga, A., Ma, C., & Marlowe, J. L. (2009). The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol*, 77(4), 713-722. doi:S0006-2952(08)00590-X [pii]
- Puga, A., Marlowe, J., Barnes, S., Chang, C. Y., Maier, A., Tan, Z., . . . Knudsen, E. S. (2002). Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology*, 181-182, 171-177.
- Puga, A., Tomlinson, C. R., & Xia, Y. (2005). Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochem Pharmacol*, 69(2), 199-207.
- Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E., & Woodgett, J. R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*, 353(6345), 670.
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer*, 11(11), 761-774.
- Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., . . . Weiner, H. L. (2008). Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 453(7191), 65-71. doi:nature06880 [pii]
- Radziskeuskaya, A., & Silva, J. C. (2014). Do all roads lead to Oct4? the emerging concepts of induced pluripotency. *Trends Cell Biol*, 24(5), 275-284. doi:10.1016/j.tcb.2013.11.010
- Ralston, A., Cox, B. J., Nishioka, N., Sasaki, H., Chea, E., Rugg-Gunn, P., . . . Rossant, J. (2010). Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development*, 137(3), 395-403.
- Ray, S. S., & Swanson, H. I. (2004). Dioxin-induced immortalization of normal human keratinocytes and silencing of p53 and p16INK4a. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27187-27193.
- Reiner, D. J., & Lundquist, E. A. (2016). Small GTPases. *WormBook*, 2016, 1-99.
- Rey-Barroso, J., Alvarez-Barrientos, A., Rico-Leo, E., Contador-Troca, M., Carvajal-Gonzalez, J. M., Echarri, A., . . . Fernandez-Salguero, P. M. (2014). The Dioxin receptor modulates Caveolin-1 mobilization during directional migration: role of cholesterol. *Cell Communication and Signaling*, 12(1), 57.
- Rey-Barroso, J., Colo, G. P., Alvarez-Barrientos, A., Redondo-Munoz, J., Carvajal-Gonzalez, J. M., Mulero-Navarro, S., . . . Fernandez-Salguero, P. M. (2013). The dioxin receptor controls beta1 integrin activation in fibroblasts through a Cbp-Csk-Src pathway. *Cell Signal*, 25(4), 848-859. doi:10.1016/j.cellsig.2013.01.010
- Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., & Hankinson, O. (1992). Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science*, 256(5060), 1193-1195.
- Richter, C. A., Tillitt, D. E., & Hannink, M. (2001). Regulation of subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). *Arch Biochem Biophys*, 389(2), 207-217.

- Rico-Leo, E. M., Alvarez-Barrientos, A., & Fernandez-Salguero, P. M. (2013). Dioxin receptor expression inhibits basal and transforming growth factor beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem*, 288(11), 7841-7856. doi:10.1074/jbc.M112.425009
- Rico-Leo, E. M., Moreno-Marin, N., Gonzalez-Rico, F. J., Barrasa, E., Ortega-Ferrusola, C., Martin-Munoz, P., . . . Fernandez-Salguero, P. M. (2016). piRNA-associated proteins and retrotransposons are differentially expressed in murine testis and ovary of aryl hydrocarbon receptor deficient mice. *Open Biol*, 6(12). doi:10.1098/rsob.160186
- Ritschka, B. (2018). *Investigating senescence in cellular plasticity and tissue regeneration*. Universitat Pompeu Fabra,
- Ritschka, B., Storer, M., Mas, A., Heinzmann, F., Ortells, M. C., Morton, J. P., . . . Keyes, W. M. (2017). The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes & development*, 31(2), 172-183.
- Roberts, B. J., & Whitelaw, M. L. (1999). Degradation of the basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway. *J Biol Chem*, 274(51), 36351-36356.
- Rock, J. R., & Hogan, B. L. (2011). Epithelial progenitor cells in lung development, maintenance, repair, and disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, 493-512.
- Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H., & Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*, 280(26), 24731-24737. doi:10.1074/jbc.M502573200
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescenceFour faces of senescence. *The Journal of cell biology*, 192(4), 547-556.
- Rodier, F., Coppe, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Munoz, D. P., Raza, S. R., . . . Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*, 11(8), 973-979. doi:10.1038/ncb1909
- Rojas, J. M., Oliva, J. L., & Santos, E. (2011). Mammalian son of sevenless Guanine nucleotide exchange factors: old concepts and new perspectives. *Genes & cancer*, 2(3), 298-305.
- Roman, A. C., Benitez, D. A., Carvajal-Gonzalez, J. M., & Fernandez-Salguero, P. M. (2008). Genome-wide B1 retrotransposon binds the transcription factors dioxin receptor and Slug and regulates gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(5), 1632-1637. doi:0708366105 [pii]
- Roman, A. C., Carvajal-Gonzalez, J. M., Rico-Leo, E. M., & Fernandez-Salguero, P. M. (2009). Dioxin receptor deficiency impairs angiogenesis by a mechanism involving VEGF-A depletion in the endothelium and transforming growth factor-beta overexpression in the stroma. *J Biol Chem*, 284(37), 25135-25148. doi:M109.013292 [pii]
- Roman, A. C., Gonzalez-Rico, F. J., Molto, E., Hernando, H., Neto, A., Vicente-Garcia, C., . . . Fernandez-Salguero, P. M. (2011). Dioxin receptor and SLUG transcription factors regulate the insulator activity of B1 SINE retrotransposons via an RNA polymerase switch. *Genome Res*, 21(3), 422-432. doi:10.1101/gr.111203.110
- Rosner, M. H., Vigano, M. A., Ozato, K., Timmons, P. M., Poirie, F., Rigby, P. W., & Staudt, L. M. (1990). A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*, 345(6277), 686.
- Rossant, J., & Papaioannou, V. (1985). Outgrowth of embryonal carcinoma cells from injected blastocysts in vitro correlates with abnormal chimera development in vivo. *Experimental cell research*, 156(1), 213-220.

- Rowlands, J. C., & Gustafsson, J. A. (1997). Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol*, 27(2), 109-134.
- Ryu, Y. S., Kang, K. A., Piao, M. J., Ahn, M. J., Yi, J. M., Bossis, G., . . . Hyun, J. W. (2019). Particulate matter-induced senescence of skin keratinocytes involves oxidative stress-dependent epigenetic modifications. *Experimental & molecular medicine*, 51(9).
- Sadek, C. M., & Allen-Hoffmann, B. L. (1994). Suspension-mediated induction of Hepa 1c1c7 Cyp1a-1 expression is dependent on the Ah receptor signal transduction pathway. *J Biol.Chem.*, 269(50), 31505-31509.
- Sadek, C. M., Jalaguier, S., Feeney, E. P., Aitola, M., Damdimopoulos, A. E., Pelto-Huikko, M., & Gustafsson, J. A. (2000). Isolation and characterization of AINT: a novel ARNT interacting protein expressed during murine embryonic development. *Mech Dev*, 97(1-2), 13-26.
- Safe, S., Wang, F., Porter, W., Duan, R., & McDougal, A. (1998). Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol Lett*, 102-103, 343-347.
- Sager, R. (1991). Senescence as a mode of tumor suppression. *Environmental health perspectives*, 93, 59-62.
- Saiz, N., & Plusa, B. (2013). Early cell fate decisions in the mouse embryo. *Reproduction*, 145(3), R65-R80.
- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W. K., Luna, A., La, K. C., . . . Saghafeinia, S. (2018). Oncogenic signaling pathways in the cancer genome atlas. *Cell*, 173(2), 321-337. e310.
- Santiago-Josefat, B., & Fernandez-Salguero, P. M. (2003). Proteasome inhibition induces nuclear translocation of the dioxin receptor through an Sp1 and protein kinase C-dependent pathway. *J Mol Biol*, 333(2), 249-260.
- Santiago-Josefat, B., Mulero-Navarro, S., Dallas, S. L., & Fernandez-Salguero, P. M. (2004a). Overexpression of latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein 1 (LTBP-1) in dioxin receptor-null mouse embryo fibroblasts. *J Cell Sci*, 117(Pt 6), 849-859.
- Santiago-Josefat, B., Mulero-Navarro, S., Dallas, S. L., & Fernandez-Salguero, P. M. (2004b). Overexpression of latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein 1 (LTBP-1) in dioxin receptor-null mouse embryo fibroblasts. *J Cell Sci*, 117(Pt 6), 849-859.
- Santiago-Josefat, B., Pozo-Guisado, E., Mulero-Navarro, S., & Fernandez-Salguero, P. M. (2001). Proteasome inhibition induces nuclear translocation and transcriptional activation of the dioxin receptor in mouse embryo primary fibroblasts in the absence of xenobiotics. *Mol Cell Biol*, 21(5), 1700-1709.
- Sartor, M. A., Schnekenburger, M., Marlowe, J. L., Reichard, J. F., Wang, Y., Fan, Y., . . . Puga, A. (2009). Genomewide analysis of aryl hydrocarbon receptor binding targets reveals an extensive array of gene clusters that control morphogenetic and developmental programs. *Environ Health Perspect*, 117(7), 1139-1146. doi:10.1289/ehp.0800485
- Sauzeau, V., Carvajal-Gonzalez, J. M., Riobos, A. S., Sevilla, M. A., Menacho-Marquez, M., Roman, A. C., . . . Bustelo, X. R. (2011). Transcriptional factor aryl hydrocarbon receptor (Ahr) controls cardiovascular and respiratory functions by regulating the expression of the Vav3 proto-oncogene. *J Biol Chem*, 286(4), 2896-2909. doi:10.1074/jbc.M110.187534
- Savouret, J.-F., Antenos, M., Quesne, M., Xu, J., Milgrom, E., & Casper, R. F. (2001). 7-Ketocholesterol Is an Endogenous Modulator for the Arylhydrocarbon Receptor. *J. Biol. Chem.*, 276(5), 3054-3059.
- Schaldach, C. M., Riby, J., & Bjeldanes, L. F. (1999). Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry*, 38(23), 7594-7600.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., & Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*, 277(5324), 333-339.

- Schmelzer, E., & Reid, L. M. (2008). EpCAM expression in normal, non-pathological tissues. *Front Biosci*, 13(8), 3096-3100.
- Schmidt, J. V., Su, G. H., Reddy, J. K., Simon, M. C., & Bradfield, C. A. (1996). Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(13), 6731-6736.
- Schubbert, S., Zenker, M., Rowe, S. L., Böll, S., Klein, C., Bollag, G., . . . Wehner, L.-E. (2006). Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nature genetics*, 38(3), 331.
- Sedelnikova, O. A., Horikawa, I., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Bonner, W. M., & Barrett, J. C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nature cell biology*, 6(2), 168.
- Seifert, A., Taubert, H., Hombach-Klonisch, S., Fischer, B., & Navarrete Santos, A. (2009). TCDD mediates inhibition of p53 and activation of ERalpha signaling in MCF-7 cells at moderate hypoxic conditions. *Int J Oncol*, 35(2), 417-424.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5), 593-602.
- Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., . . . Ishikawa, T. (2000). Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(2), 779-782.
- Shyh-Chang, N., Daley, G. Q., & Cantley, L. C. (2013). Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development*, 140(12), 2535-2547.
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T. W., Guo, G., van Oosten, A. L., Barrandon, O., . . . Smith, A. (2009). Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*, 138(4), 722-737. doi:10.1016/j.cell.2009.07.039
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017). RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell*, 170(1), 17-33.
- Sinal, C. J., & Bend, J. R. (1997). Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Induction of Cyp1a1 by Bilirubin in Mouse Hepatoma Hepa 1c1c7 Cells. *Mol Pharmacol*, 52(4), 590-599.
- Singh, K. P., Bennett, J. A., Casado, F. L., Walrath, J. L., Welle, S. L., & Gasiewicz, T. A. (2014). Loss of aryl hydrocarbon receptor promotes gene changes associated with premature hematopoietic stem cell exhaustion and development of a myeloproliferative disorder in aging mice. *Stem cells and development*, 23(2), 95-106.
- Singh, S. S., Hord, N. G., & Perdew, G. H. (1996). Characterization of the activated form of the aryl hydrocarbon receptor in the nucleus of HeLa cells in the absence of exogenous ligand. *Arch Biochem Biophys*, 329(1), 47-55.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M., & Karin, M. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*, 354(6353), 494.
- Solter, D. (2006). From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nature Reviews Genetics*, 7(4), 319.
- Song, J., Clagett-Dame, M., Peterson, R. E., Hahn, M. E., Westler, W. M., Sicinski, R. R., & DeLuca, H. F. (2002). A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 14694-14699.
- Song, J., Clagett-Dame, M., Peterson, R. E., Hahn, M. E., Westler, W. M., Sicinski, R. R., & DeLuca, H. F. (2002). A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(23), 14694-14699.



- Sonnenfeld, M., Ward, M., Nystrom, G., Mosher, J., Stahl, S., & Crews, S. (1997). The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Development*, 124(22), 4571-4582.
- Strumpf, D., Mao, C.-A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., & Rossant, J. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development*, 132(9), 2093-2102.
- Sturmlechner, I., Durik, M., Sieben, C. J., Baker, D. J., & Van Deursen, J. M. (2017). Cellular senescence in renal ageing and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 13(2), 77.
- Su, J. M., Lin, P., Wang, C. K., & Chang, H. (2009). Overexpression of cytochrome P450 1B1 in advanced non-small cell lung cancer: a potential therapeutic target. *Anticancer Res*, 29(2), 509-515.
- Sun, N., Youle, R. J., & Finkel, T. (2016). The mitochondrial basis of aging. *Molecular cell*, 61(5), 654-666.
- Sutherland, K. D., Song, J.-Y., Kwon, M. C., Proost, N., Zevenhoven, J., & Berns, A. (2014). Multiple cells-of-origin of mutant K-Ras-induced mouse lung adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(13), 4952-4957.
- Suwińska, A., Czołowska, R., Ożdżeński, W., & Tarkowski, A. K. (2008). Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Developmental biology*, 322(1), 133-144.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676. doi:S0092-8674(06)00976-7 [pii]
- 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Talari, N. K., Panigrahi, M. K., Madigubba, S., & Phanithi, P. B. (2018). Overexpression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signalling pathway in human meningioma. *J Neurooncol*. doi:10.1007/s11060-017-2730-3
- Tammela, T., Sanchez-Rivera, F. J., Cetinbas, N. M., Wu, K., Joshi, N. S., Helenius, K., . . . Wesselhoeft, R. A. (2017). A Wnt-producing niche drives proliferative potential and progression in lung adenocarcinoma. *Nature*, 545(7654), 355-359.
- Tan, Z., Chang, X., Puga, A., & Xia, Y. (2002). Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochem Pharmacol*, 64(5-6), 771-780. doi:S0006295202011383 [pii]
- Thackaberry, E. A., Gabaldon, D. M., Walker, M. K., & Smith, S. M. (2002). Aryl hydrocarbon receptor null mice develop cardiac hypertrophy and increased hypoxia-inducible factor-1alpha in the absence of cardiac hypoxia. *Cardiovasc Toxicol*, 2(4), 263-274. doi:CT:2:4:263 [pii]
- Tian, Y., Ke, S., Denison, M. S., Rabson, A. B., & Gallo, M. A. (1999). Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J Biol Chem*, 274(1), 510-515.
- Tian, Y., Rabson, A. B., & Gallo, M. A. (2002). Ah receptor and NF-kappaB interactions: mechanisms and physiological implications. *Chem Biol Interact*, 141(1-2), 97-115. doi:S0009279702000686 [pii]
- Torre, L., Bray, F., Siegel, R., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: Cancer J Clin* 65: 87-108. In.
- Tuveson, D. A., Shaw, A. T., Willis, N. A., Silver, D. P., Jackson, E. L., Chang, S., . . . Crowley, D. (2004). Endogenous oncogenic K-rasG12D stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer cell*, 5(4), 375-387.

- Vacher, S., Castagnet, P., Chemlali, W., Lallemand, F., Meseure, D., Pocard, M., . . . Perrot-Applanat, M. (2018). High AHR expression in breast tumors correlates with expression of genes from several signaling pathways namely inflammation and endogenous tryptophan metabolism. *PLoS One*, 13(1).
- Van Blerkom, J. (2009). *Mitochondria in early mammalian development*. Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology.
- van den Berg, D. L., Snoek, T., Mullin, N. P., Yates, A., Bezstarosti, K., Demmers, J., . . . Poot, R. A. (2010). An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 6(4), 369-381.
- van den Bogaard, E. H., Podolsky, M. A., Smits, J. P., Cui, X., John, C., Gowda, K., . . . Glick, A. B. (2015). Genetic and pharmacological analysis identifies a physiological role for the AHR in epidermal differentiation. *J Invest Dermatol*, 135(5), 1320-1328. doi:10.1038/jid.2015.6
- Vatansever, S., Erman, B., & Gümüş, Z. H. (2019). Oncogenic G12D mutation alters local conformations and dynamics of K-Ras. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O'Garra, A., & Stockinger, B. (2009). Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J Exp Med*, 206(1), 43-49. doi:10.1084/jem.20081438
- Ventura, A., Kirsch, D. G., McLaughlin, M. E., Tuveson, D. A., Grimm, J., Lintault, L., . . . Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*, 445(7128), 661-665.
- Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer*, 10(12), 842.
- Vogel, C. F., Li, W., Sciallo, E., Newman, J., Hammock, B., Reader, J. R., . . . Matsumura, F. (2007). Pathogenesis of aryl hydrocarbon receptor-mediated development of lymphoma is associated with increased cyclooxygenase-2 expression. *Am J Pathol*, 171(5), 1538-1548. doi:S0002-9440(10)62415-7 [pii]
- 10.2353/ajpath.2007.070406
- Vogel, C. F., & Matsumura, F. (2003). Interaction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) with induced adipocyte differentiation in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) involves tyrosine kinase c-Src. *Biochem Pharmacol*, 66(7), 1231-1244. doi:S0006295203004040 [pii]
- Vogel, C. F., Sciallo, E., Park, S., Liedtke, C., Trautwein, C., & Matsumura, F. (2004). Dioxin increases C/EBPbeta transcription by activating cAMP/protein kinase A. *J Biol Chem*, 279(10), 8886-8894. doi:10.1074/jbc.M310190200
- M310190200 [pii]
- Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martin-Ruiz, C., & Von Zglinicki, T. (2009). DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging cell*, 8(3), 311-323.
- Wang, C., Xu, C.-X., Bu, Y., Bottum, K. M., & Tischkau, S. A. Beta-naphthoflavone (DB06732) Mediates Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cell Cycle Arrest through AhR-Dependent Inhibition of PI3K/AKT pathway and Activation of MAPK/ERK.
- Wang, J., Alexander, P., Wu, L., Hammer, R., Cleaver, O., & McKnight, S. L. (2009). Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine catabolism. *Science*, 325(5939), 435-439.
- Wang, J., Geesman, G. J., Hostikka, S. L., Atallah, M., Blackwell, B., Lee, E., . . . Halperin, E. (2011). Inhibition of activated pericentromeric SINE/Alu repeat transcription in senescent human adult stem cells reinstates self-renewal. *Cell cycle*, 10(17), 3016-3030.

- Wang, Q., Kurita, H., Carreira, V., Ko, C.-I., Fan, Y., Zhang, X., . . . Puga, A. (2015). Ah receptor activation by dioxin disrupts activin, BMP, and WNT signals during the early differentiation of mouse embryonic stem cells and inhibits cardiomyocyte functions. *Toxicological Sciences*, 149(2), 346-357.
- Wang, S., Ge, K., Roeder, R. G., & Hankinson, O. (2004). Role of mediator in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, 279(14), 13593-13600.
- Wang, S., & Hankinson, O. (2002). Functional involvement of the Brahma/SWI2-related gene 1 protein in cytochrome P4501A1 transcription mediated by the aryl hydrocarbon receptor complex. *J Biol Chem*, 277(14), 11821-11827.
- Wang, Y.-D., Cai, N., Wu, X., Cao, H., Xie, L., & Zheng, P. (2013). OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell death & disease*, 4(8), e760.
- Ward, P. S., & Thompson, C. B. (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer cell*, 21(3), 297-308.
- Weiss, C., Faust, D., Schreck, I., Ruff, A., Farwerck, T., Melenberg, A., . . . Vondráček, J. (2008). TCDD deregulates contact inhibition in rat liver oval cells via Ah receptor, JunD and cyclin A. *Oncogene*, 27(15), 2198-2207.
- Weiss, C., Kolluri, S. K., Kiefer, F., & Gottlicher, M. (1996). Complementation of Ah receptor deficiency in hepatoma cells: negative feedback regulation and cell cycle control by the Ah receptor. *Exp Cell Res*, 226(1), 154-163.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., & Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(11), 875.
- Whitlock, J. P., Jr. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39, 103-125.
- Wicklow, E., Blij, S., Frum, T., Hirate, Y., Lang, R. A., Sasaki, H., & Ralston, A. (2014). HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst. *PLoS genetics*, 10(10), e1004618.
- Wilhelmsson, A., Cuthill, S., Denis, M., Wikstrom, A. C., Gustafsson, J. A., & Poellinger, L. (1990). The specific DNA binding activity of the dioxin receptor is modulated by the 90 kd heat shock protein. *Embo J*, 9(1), 69-76.
- Wincent, E., Amini, N., Luecke, S., Glatt, H., Bergman, J., Crescenzi, C., . . . Rannug, U. (2009). The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J Biol Chem*, 284(5), 2690-2696. doi:10.1074/jbc.M808321200
- Wong, D. J., Liu, H., Ridky, T. W., Cassarino, D., Segal, E., & Chang, H. Y. (2008). Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell stem cell*, 2(4), 333-344.
- Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., & Safe, S. (2000). Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes. *FEBS Lett*, 478(1-2), 109-112. doi:S0014-5793(00)01830-5 [pii]
- Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R., & Safe, S. (2003). The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol Cell Biol*, 23(6), 1843-1855.
- Wu, G., Gentile, L., Fuchikami, T., Sutter, J., Psathaki, K., Esteves, T. C., . . . Abe, K. (2010). Initiation of trophoblast lineage specification in mouse embryos is independent of Cdx2. *Development*, 137(24), 4159-4169.

- Wu, P.-Y., Liao, Y.-F., Juan, H.-F., Huang, H.-C., Wang, B.-J., Lu, Y.-L., . . . Hsu, W.-M. (2014). Aryl hydrocarbon receptor downregulates MYCN expression and promotes cell differentiation of neuroblastoma. *PLoS one*, 9(2).
- Xu, X., Rock, J. R., Lu, Y., Futtner, C., Schwab, B., Guinney, J., . . . Onaitis, M. W. (2012). Evidence for type II cells as cells of origin of K-Ras-induced distal lung adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), 4910-4915.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., . . . Lowe, S. W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 445(7128), 656-660.
- Yamanaka, Y., Lanner, F., & Rossant, J. (2010). FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development*, 137(5), 715-724.
- Yang, X., Liu, D., Murray, T. J., Mitchell, G. C., Hesterman, E. V., Karchner, S. I., . . . Sherr, D. H. (2005). The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells. *Oncogene*, 24(53), 7869-7881.
- Yang, X., Solomon, S., Fraser, L. R., Trombino, A. F., Liu, D., Sonenshein, G. E., . . . Sherr, D. H. (2008). Constitutive regulation of CYP1B1 by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in pre-malignant and malignant mammary tissue. *J Cell Biochem*, 104(2), 402-417. doi:10.1002/jcb.21630
- Yu, F.-X., & Guan, K.-L. (2013). The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & development*, 27(4), 355-371.
- Yu, H., Du, Y., Zhang, X., Sun, Y., Li, S., Dou, Y., . . . Zhao, W. (2014). The aryl hydrocarbon receptor suppresses osteoblast proliferation and differentiation through the activation of the ERK signaling pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*, 280(3), 502-510. doi:10.1016/j.taap.2014.08.025
- Zaher, H., Fernandez-Salguero, P. M., Letterio, J., Sheikh, M. S., Fornace, A. J., Jr., Roberts, A. B., & Gonzalez, F. J. (1998). The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis. *Mol Pharmacol*, 54(2), 313-321.
- Zhang, J., Nuebel, E., Daley, G. Q., Koehler, C. M., & Teitell, M. A. (2012). Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal. *Cell stem cell*, 11(5), 589-595.
- Zhang, X., Meng, X., Chen, Y., Leng, S. X., & Zhang, H. (2017). The biology of aging and cancer: frailty, inflammation, and immunity. *The Cancer Journal*, 23(4), 201-205.
- Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.-Y., & Guan, K.-L. (2010). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF $\beta$ -TRCP. *Genes & development*, 24(1), 72-85.
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., . . . Li, L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & development*, 21(21), 2747-2761.